

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Anatomie a fyziologie rostlin (P1524)

Studijní obor: Anatomie a fyziologie rostlin (1507V000)



Mgr. Ondřej Borovec

Houbové symbiózy v kořenech mořských trav rodu *Posidonia*: distribuce, fenotypová a genotypová variabilita a potenciální ekofyziologický význam

Fungal symbioses in roots of the seagrass genus *Posidonia*: distribution, phenotypic and genetic variability and potential ecophysiological significance

Disertační práce

Školitel: RNDr. Martin Vohník, Ph.D.

Praha, 2018

Charles University, Faculty of Science

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 29.7.2018

Podpis

Obsah

Prohlášení	2
Obsah	3
Úvod	4
Abstrakt	6
Klíčová slova	7
Abstract	8
Keywords	9
Úvod do problematiky	10
Cíle práce	15
Literární přehled	16
Materiály a metody	21
Výsledky	26
Diskuze	29
Závěry práce	35
Seznam literatury	36
Seznam publikací uchazeče a podíl studenta na jednotlivých publikacích	44
Přílohy	45

Úvod

Na oddělení mykorhizních symbióz AV ČR probíhal projekt výzkumu mykorhizních a endofytických hub v kořenech ponořených rostlin ze sladkovodních jezer. Můj školitel získal vzorky mořské trávy posidonie Neptunovy z lokality Borak v jižním Chorvatsku. Navrhl, abych prohlédl kořeny p. Neptunovy pod mikroskopem a prověřil, zda se v nich nevyskytují endofytické houby. Ačkoli původním záměrem bylo zejména to, abych se naučil pracovat s kořeny, překvapivě jsem přítomnost houbových hyf v kořenech posidonie zaznamenal. Nalezené houby morfologicky připomínaly DSE, endofyty široce rozšířené v terestrickém prostředí, ovšem vyskytující se i v kořenech sladkovodních rostlin. Podle dostupných zdrojů tato symbióza dosud nikdy nebyla v kořenech mořských trav pozorována. Tématikou symbióz hub a kořenů vodních rostlin se zvláštním zaměřením na trvale ponořené mořské rostliny jsem se zabýval ve své bakalářské práci.

Získali jsme vzorky p. Neptunovy ze severozápadního Středomoří z rozsáhlé oblasti od Španělska po severozápad Itálie a zjistili jsme, že nově objevená houbová symbióza se vyskytuje v celém zkoumaném areálu. Pozorovali jsme vzorky kořenů hostitelské rostliny pod mikroskopem a zaznamenali charakteristické struktury tvořené endofytickou houbou. Jednalo se o povrchový plášť, vnitrokořenové hyfy a vnitrobuněčná mikrosklerocia. Popis a charakteristika symbiózy byly popsány v první publikaci, která vyšla v roce 2015.

Dále byla zjištěna taxonomická příslušnost zkoumaných endofytů ze severozápadního Středomoří a Chorvatska. Vzorky hub byly izolovány na kultivačním médiu a vypěstované izoláty následně osekvenovány. Velká většina izolátů příslušela jediné dosud nepopsané linii v rámci vrčkovýtrusých hub, řádu Pleosporales, nadále popisována jako *Pleosporales* sp. MV-2012. Druhým nejrozšířenějším taxonem byla jiná vrčkovýtrusá houba z řádu *Lulworthiales* příbuzná rodům *Lulworthia* a *Lulwoana*, dále popisovaná jako *Lulworthiales* sp. MV-2012. Popis této symbiózy a zjišťování taxonomické příslušnosti těchto hub byly hlavním tématem mé diplomové práce.

Zatímco předchozí studie byly prováděny na rostlinách z rozsáhlého území od Španělska po Chorvatsko, náš další výzkum probíhal na několika lokalitách v rámci relativně malého území o rozloze několika desítek kilometrů čtverečních v okolí Pakoštaně ve středním Chorvatsku. Kromě izolace a kultivace hub na médiu jsme využili i další metodu – pyrosekvenaci. Výsledky byly velmi podobné těm ze severozápadního Středomoří – výrazně dominovala houba *Pleosporales* sp. MV-2012, následována taxonem *Lulworthiales* sp. MV-2012.

Až dosud jsme zkoumali houbovou kolonizaci v kořenech dospělých rostlin. Chtěli jsme se však zaměřit také na otázku, zda jsou tyto endofytické houby přítomné i v kořenech mladších rostlin

a semenáčků. Výskyt semenáčků posidonie Neptunovy je poměrně vzácný, nám se však podařilo najít lokality v Černé Hoře s výskytem malých semenáčků i poněkud vzrostlejších juvenilních rostlin. Dále jsme na jedné černoohorské lokalitě objevili porost posidonií na netypickém jílovitém podkladu. Naše další studie se zabývala vlivem ontogenetického stadia a typu substrátu na houbovou kolonizace.

Posidonie Neptunova byla až dosud známa jako rostlina, která kořenové vlášení tvoří řídce nebo vůbec. Během studia kořenů semenáčků i rostlin z jílovitého podkladu jsme však zjistili četný výskyt kořenového vlášení, které občas rostlo i velmi hustě. Rostliny, které netvoří mykorhizní asociace, se často vyznačují hustým kořenovým vlášením. Chtěli jsme proto zjistit, zda existuje vztah mezi výskytem vlášení a houbových symbiontů.

Dále jsme objevili, že kořenové vlásy posidonie často tvoří apikální struktury podobné rozvětveným “prstíkům” nebo přísavkám. Tyto struktury poskytují adhezi k částčkám substrátu a zlepšují uchycení rostliny na mořském dně. Některé kořenové vlásy se vyznačovaly spirální strukturou. Jednalo se o patrně již mrtvé vlásy, jejichž zpěvněné části přetrvávaly a umožňovaly rostlině ještě zvýšit adhezi k substrátu.

Abstrakt

Kořeny rostlin hostí široké spektrum endofytických hub, od parazitických přes neutralistické až po mutualistické mykorhizní houby. V terestrickém prostředí jsou tyto houby poměrně dobře prozkoumány, ale co se týče vodních rostlin, naše znalosti jsou značně omezené. Obzvláště málo je známo o houbách asociovaných s kořeny mořských trav, jediné skupiny cévnatých rostlin trvale ponořených pod mořskou hladinou.

Zaměřili jsme se na studium kořenů mořské trávy posidonie Neptunovy, endemického druhu Středozemního moře. V jejích kořenech jsme zjistili přítomnost endofytických hub. S využitím mikroskopických technik jsme studovali jejich morfologii. Izolací a následnými molekulárními analýzami mykobiontů jsme pak odhalili jejich taxonomickou příslušnost.

V celém rozsáhlém areálu Středozemního moře od Španělska po jižní Turecko jsme zaznamenali výskyt symbiózy kořenů p. Neptunovy s tmavě zbarvenou septovanou houbou. Tato houba se vyznačuje charakteristickými strukturami, kterými jsou povrchové hyfy tvořící někdy souvislý plášť nebo hustou hyfovou síť, dále vnitrokořenové hyfy rostoucí mezi buňkami, řidčeji i uvnitř buněk, a konečně vnitrobuněčná mikrosklerocia. Celkově se tento endofyt podobá dark septate endophytes (DSE), běžným symbiontům terestrických i sladkovodních rostlin.

V několika následných studiích jsme se zaměřili na izolace houbových endofytů, jejich kultivaci a následné určení taxonomické příslušnosti. Zkoumali jsme vzorky z rozsáhlejší oblasti severozápadního Středomoří od Španělska po Itálii spolu s dvěma vzorky z jižního Chorvatska. Dále jsme se věnovali studiím z méně rozsáhlých regionů jako střední Chorvatsko, Sicílie, jižní Chorvatsko a západní, jihozápadní a jižní Turecko. Celkově jednoznačně dominovaly vřeckovýtrusé houby, konkrétně převládala tmavě zbarvená septovaná houba, která byla taxonomicky identifikována jako "Pleosporales sp. MV-2012". Druhým nejčastěji izolovaným morfotypem byla žlutě zbarvená houba následně určená jako "Lulworthiales sp. MV-2012". Ostatní druhy byly zastoupeny nanejvýše v počtu několika exemplářů. Obdobné výsledky, tedy dominanci houby Pleosporales sp. MV-2012, výskyt druhu Lulworthiales sp. MV-2012 a velmi nízkou četnost dalších druhů hub, jsme zjistili i při využití pyrosekvenace vzorků ze středního Chorvatska.

V terestrickém prostředí je časté, že výskyt specifické mykorhizní asociace ovlivňuje výskyt kořenového vlášení a přebírá jeho funkci ve výživě rostliny. V závěrečné studii jsme se proto zabývali hledáním vztahu mezi přítomností a hustotou kořenového vlášení a kolonizací kořenů p. Neptunovy endofytickými houbami. U mladých semenáčků jsme pozorovali bohatý výskyt kořenového vlášení. Endofytické houby se u nejmladších rostlin vůbec nevyskytovaly. U starších semenáčků a dospělých rostlin hustota a četnost výskytu kořenového vlášení klesala, naopak jejich

kořeny byly často kolonizovány endofytickými houbami. U kořenového vlášení jsme zaznamenali výskyt morfologicky význačných apikálních struktur a spirálovitě ztlustělých buněčných stěn. Tyto adaptace slouží rostlinám k uchycení v substrátu.

Zdá se, že posidonie Neptunova spolu s endofytickou houbou *Pleosporales* sp. MV-2012 spolu tvoří velmi specifickou a morfologicky charakteristickou symbiózu. Tato asociace se navzájem ovlivňuje s výskytem kořenového vlášení a potenciálně má vliv i na život a výživu hostitelské mořské trávy.

Klíčová slova

mořské trávy, mořské houby, dark septate endophytes, Středozemní moře, posidonie Neptunova, *Pleosporales*, kořenové vlášení

Abstract

Plant roots host a wide spectrum of endophytic fungi ranging from parasites through neutralistic fungi to mutualistic mycorrhizal fungi. In most of terrestrial ecosystems, these groups of symbiotic fungi are well documented. However, much less is known about fungal endophytes of aquatic plants, especially the only group of submerged marine plants, seagrasses.

We focused on roots of the seagrass species *Posidonia oceanica* which is a Mediterranean endemite. Its roots hosted an abundant presence of endophytic fungi. We examined the roots using optical and electron microscopy in order to study its morphology. We isolated the mycobionts and determined their taxonomic classification.

A specific symbiosis of *P. oceanica* roots and dark coloured septate fungus has been recorded all over a vast area of the Mediterranean spreading from southern Spain to south Turkey. The fungus forms distinctive and typical structures: superficial hyphae occasionally forming hyphal sheaths or dense hyphal nets, intraradical hyphae colonizing extracellular space and, occasionally, primary cortex cells, and finally intracellular microsclerotia. The colonization pattern of the fungi resembles dark septate endophytes (DSE), group of fungi commonly found in roots of both terrestrial and freshwater plants.

In our following studies, we isolated the fungal endophytes of *P. oceanica*, cultivated axenic cultures and determined the mycobionts. In our first study, samples from a large area of the northwestern Mediterranean including Spain, south France, northwestern Italy and southern Croatia was examined. Subsequently, we focused on studies performed in smaller regions such as central Croatia, Sicily, southern Croatia, western, southwestern and southern Turkey. Globally, the fungal communities were dominated by ascomycetes, majority of them being represented by a dark septate fungus determined as “Pleosporales sp. MV-2012”. Second most abundant isolate was an ochre fungus determined as “Lulworthiales sp. MV-2012”. Other taxons were represented by merely single or very few isolates. Samples from central Croatia were further analyzed using pyrosequencing. Similar results were recorded as the community was dominated by Pleosporales sp. MV-2012 with Lulworthiales sp. MV-2012 also being recorded.

In terrestrial plants, colonization of roots by specific mycorrhizal association often influences root hair formation. Mycorrhizal fungi take over the role of root hairs in plant nutrition. In our final

study, we tried to discover a potential relationship between presence and abundance of root hairs and fungal colonization of *P. oceanica* roots. Young seedlings possessed a dense root hair cover whereas they were completely lacking fungal colonization. On the other hand, established seedlings and adult plants were frequently colonized by endophytic fungi but their root hair abundance diminished. The root hairs were frequently forming morphologically distinctive apical structures and spirally formed cell walls. These adaptations provided increased attachment to the substrate.

Obviously, *P. oceanica* and endophytic fungus known as *Pleosporales* sp. MV-2012 form a specific and morphologically distinctive symbiosis. This association influences the occurrence and density of root hairs and has a potential role in life and nutrition of the host seagrass.

Keywords

seagrasses, marine fungi, dark septate endophytes, Mediterranean, *Posidonia oceanica*, *Pleosporales*, root hairs

1 Úvod do problematiky

Jednou ze základních charakteristik všech živých organismů je jejich interakce s prostředím i mezi sebou navzájem. Dlouhodobější a užší soužití dvou nebo více organismů je v současné době označováno jako symbióza. Nejčastěji jsou symbiózy děleny podle výhodnosti asociací pro jednotlivé organismy, jež se jich účastní. Pro snazší nastínění jednotlivých typů symbiotických asociací uvedu jednotlivé typy vztahu dvou organismů.

Ve starší literatuře se za “symbiózu” považovaly pouze vztahy prospěšné pro oba organismy, jež se tohoto soužití účastnily. V současné době se tato oboustranně prospěšná symbióza označuje jako mutualismus (+;+). Dalšími typy symbiózy jsou: komenzálismus – jeden ze symbiontů má z asociace prospěch, druhému nijak neškodí (+;0); parazitismus – jeden ze symbiontů škodí druhému a sám díky tomu získává výhodu (+;-); neutralistická symbióza – pro oba symbionty je vzájemný vztah neutrální (0;0); amenzálismus – jeden ze symbiontů škodí tomu druhému, ale sám nemá žádný prospěch (0;-); kompetiční symbióza – oba symbionti spolu soutěží a získávají tím nevýhodu (-;-). V přírodě však situace často není takto přehledná a jednoduchá – všechny organismy tvoří rozsáhlou síť interakcí a typy vztahů mezi nimi se mohou v čase a prostoru výrazně měnit.

Jednou z nejrozšířenějších a pro život jako takový nejzásadnější symbiotickou asociací je symbióza rostlin a hub. V podstatě každá rostlina žije v symbióze s houbami a houby tvoří nezbytnou součást prostředí, v kterém se rostliny vyskytují. Není proto překvapením, že rostliny s houbami spolu asociují na kompletní škále interakcí, kterou jsem zmínil výše. Obvykle uváděnými skupinami hub podle vztahu s hostitelskou rostlinou jsou mutualistické houby, které s rostlinami tvoří asociaci označovanou jako mykorhiza, dále neutralistické endofyty a konečně parazitické houby.

Mykorhiza je označení mutualistické symbiózy mezi kořeny rostlin a houbami. Tento termín se zároveň používá pro charakteristické struktury, které mykorhizní houby tvoří na povrchu nebo uvnitř kořene. Nejdůležitější funkcí mykorhiz bývá zpravidla zprostředkování výměny látek mezi oběma symbionty. Rostlinný hostitel poskytuje svému houbovému partnerovi (obecně označovaném jako mykobiont) organické produkty fotosyntézy. Houba na oplátku dodává rostlině živiny ze substrátu. Díky rozsáhlé síti podhoubí označované jako extraradikální mycelium je mykorhizní houba schopná pronikat do mnohem většího objemu půdy, než samotné rostlinné kořeny. Spojení sfér, ze které rozpuštěné látky v půdě čerpají rostlinné kořeny, takzvané rhizosféry, a části, odkud čerpají houby, mykosféry, se nazývá mykorhizosféra.

Mykorhizní houby jsou rovněž schopny zpracovávat minerály navázané v látkách, které nejsou rostliny schopné využít. Jedná se o různé makromolekulární organické látky, ale i

anorganické sraženiny minerálů. Další důležitou funkcí mykorhizních hub je efektivnější hospodaření s vodou a ochrana před jejími ztrátami. Mycelium proniká do vzdálenějších míst v půdě, takže umožňuje využívat i pro rostlinu hůře dostupné vodní zdroje. Hustá síť, kterou hyfy tvoří, dále umožňuje efektivnější zachycení vody. V porovnání s kořeny dosahují hyfy zpravidla menšího průměru. Mohou proto pronikat i do kapilár mezi půdní částičky, které jsou pro rostlinu jinak nedostupné, a využívat tak další zásoby vody a živin.

Nejrozšířenějším typem mykorhizy je arbuskulární mykorhiza, kterou utváří více než 70 % rostlinných druhů. Tento typ asociace tvoří výlučně houbami z oddělení Glomeromycota. Tato skupina, která se původně řadila mezi houby spájkivé (Zygomycota) Rovněž velmi rozšířenou formou je ektomykorhiza, která se vyznačuje tím, že hyfy hub kolonizujících kořeny nevstupují do buněk hostitelské rostliny. Dalšími typy mykorhizních asociací jsou například erikoidní, orchideoidní nebo monotropoidní mykorhizy. Tyto typy jsou zpravidla vázány na jedinou skupinu rostlinných hostitelů, podle nichž jsou zpravidla i pojmenovány. Nearbuskulární mykorhizy jsou nejčastěji tvořeny různými skupinami vřeckovýtrusých (Ascomycota) a stopkovýtrusých (Basidiomycota) hub.

Co se týče roslin trvale žijících ve vodním prostředí, byla u některých z nich zjištěna přítomnost arbuskulárních mykorhiz. Kromě častého výskytu v kořenech suchozemských rostlin byl tento typ asociace pozorován i u vodních rostlin, a to včetně trvale ponořených druhů. Mykorhizní houby byly zaznamenány i v kořenech rostlin z trvale zasolených typů prostředí, jako jsou salinní močály a mangrovové porosty. U trvale ponořených rostlin z mořského prostředí však mykorhizy dosud pozorovány nebyly.

Další skupinou hub asociovaných s rostlinami jsou endofyty. V obecném pojetí jsou endofytické houby všechny, které tráví celý životní cyklus nebo jeho část v těle rostlinného hostitele. V užším pojetí podle trofických interakcí se endofyty nazývají ty houby, které na hostitele nemají ani pozitivní, ani negativní vliv. Tato definice je však jen učebnicovým pojmem, který ve skutečnosti často není přesný. Značná část hub označovaných jako endofyty se za určitých podmínek prostředí nebo v určité ontogenetické fázi mohou začít chovat paraziticky a napadnout svého hostitele. Na rozdíl od mykorhizních hub byl výskyt endofytických hub již několikrát zaznamenán i v kořenech jediné skupiny rostlin trvale ponořených v mořském prostředí, mořských trav, a to jak specificky mořských druhů, tak všeobecně rozšířených i ubikvitních hub. Výzkumu symbiotických hub v kořenech mořských trav se vzhledem k obtížněji dostupnému prostředí až doposud věnovalo jen malé množství studií. I proto, že výskyt hub jako takových v mořském prostředí je limitován.

Mořské trávy jsou známy jako jediná skupina cévnatých rostlin rostoucích trvale

ponořených pod mořskou hladinou. Nejedná se o monofyletickou skupinu, ale o morfologicky, anatomicky i ekologicky a ekofyziologicky podobné rostliny. Návrat mořských trav do mořského prostředí proběhl nezávisle na sobě v rámci 4 příbuzných čeledí z řádu žabníkotvarých (Alismatales) patřícího mezi jednoděložné.

Mořské trávy byly při přechodu do mořského prostředí nuceny přijmout celou řadu adaptací, které jim pomáhají přežít v podmínkách zcela odlišných od těch na souši. Coby trvale ponořené rostliny samozřejmě nemají problémy s nedostatkem dostupné vody. Vyskytují se ovšem v hypersalinním prostředí a působí na ně osmotický tlak, který by potenciálně mohl způsobit ztráty vody. Tyto rostliny však mají ve srovnání se svými terestrickými i sladkovodními příbuznými poněkud jinou genetickou výbavu a zvláštní geny pro toleranci zvýšené salinity v okolí. Ty umožňují mořským travám akumulovat ve vakuolách sodné kationty v koncentraci vyšší, než v jaké jsou přítomny v mořské vodě, a tím efektivně osmotickým ztrátám vody zabránit.

Porůstají dna moří v tropickém, subtropickém i mírném pásu. Těžištěm jejich biodiverzity je zejména indomalajská oblast, kde v oblastech kolem některých ostrovů roste až třetina známých druhů mořských trav. Na poměry mořských trav značné druhové bohatství je popsáno i u pobřeží Austrálie, částí východní Afriky, Filipín a Indie. Směrem od rovníku druhová pestrost mořských trav všeobecně klesá.

Těžištěm biodiverzity těchto rostlin v rámci evropského pobřeží je oblast Středozemního moře. Zde roste celkem 5 druhů řadících se do této skupiny. Jsou jimi *Zostera noltii*, *Zostera marina*, *Cymodocea nodosa*, *Halophila stipulacea* a *Posidonia oceanica*, v češtině známá jako posidonie Neptunova, popřípadě posidonie mořská.

Během posledních let začalo být zjevné, že ekosystém mořských trav je nesmírně významným úložištěm organického uhlíku, tvoří nedílnou součást trofických řetězců v mořském prostředí a mořské trávy tvoří symbiotické asociace s celou řadou organismů. Mořské trávy asociují se širokým spektrem organismů. Poskytují úkryt a ochranu rybám a bezobratlým z vodního sloupce. Jejich listy porůstají hostí epifytické řasy i jiné autotrofní organismy, které slouží jako potrava herbivorům. Samotné listy mořských trav však jako potrava slouží jen zřídka. Sesilní živočichové jako například mechovky rovněž epifyticky žijí na listech mořských trav. V kořenech mořských trav se vyskytují endofytické organismy, zejména bakterie a houby.

Posidonie Neptunova je endemickým druhem mořské trávy Středozemního moře. Posidonie Neptunova je nejrozšířenějším druhem mořské trávy ve Středozemním moři. V současné době je však ohrožována množstvím vlivů. Suezským průplavem proniká do Středozemního moře mořská tráva druhu *Halophila stipulacea*. Tento invazivní druh se vyznačuje rychlejším růstem a snadnější adaptací na změny podmínek v porovnání s konkurenčními původními středomořskými

druhy. V teplejších oblastech východní části Středozemního moře (zhruba od linie Tunisko-Malta-Sicílie-jih Itálie na východ) tak *H. stipulacea* z mnoha lokalit posidonii vytlačila.

Dalším nebezpečím pro mořské louky je invaze řasy druhu *Caulerpa taxifolia*. Tento druh zelené řasy původně pochází z Indického oceánu. Jeho výskyt ve Středozemním moři byl poprvé zaznamenán poblíž města Marseille v 80. letech 20. století. Předpokládá se, že sem byl přivezen zaoceánskými loděmi v nádržích s balastní vodou, která byla po plavbě vypuštěna v okolí přístavu. Tato řasa, podobně jako *H. stipulacea*, dokáže porůstat mořské dno mnohem rychleji než p. Neptunova. Zabraňuje přístupu živin ke kořenům mořských trav a efektivně zabraňuje růstu mladých rostlin na lokalitě. P. Neptunova je navíc poměrně konzervativní a nedokáže se dostatečně rychle přizpůsobovat změnám poměrů na mořském dně.

Dalšími vlivy, které mohou ohrožovat růst p. Neptunovy, jsou znečištění a změny teploty a salinity moří. Tyto faktory jsou historicky rozhodujícím kritériem určujícím areál rozšíření tohoto druhu mořské trávy a zároveň limitují jeho rozšíření na Středozemní moře.

Výskyt endofytických hub v kořenech p. Neptunovy byl dlouho téměř neprozkoumanou oblastí. Spolu s mým školitelem, Dr. Martinem Vohníkem, jsme v kořenech mořské trávy posidonie Neptunovy objevili přítomnost endofytické houby. Tématu symbiotických hub asociovaných s kořeny mořských trav jsem se věnoval již od dob svého bakalářského studia. Sepsáním této disertační práce tak navazuji na svou bakalářskou práci “Mykorhizní a endofytické houby v kořenech vodních cévnatých rostlin” a diplomovou práci “Ekofyziologický význam houbových symbióz kořenů středomořských trav”. Symbióza mezi kořeny posidonie Neptunovy a endofytickými houbami se vyznačuje několika typickými charakteristikami, kterými se liší od ostatních dosud pozorovaných houbových asociací kořenů mořských trav. Skladba druhů je poměrně úzká, zatímco ostatní studie endofytů zpravidla zaznamenaly vyšší počet izolovaných druhů hub. Izolátům z kořenů p. Neptunovy dominuje jediný taxon endofytické houby, která je, jak se zdá, široce rozšířená ve velmi rozsáhlé oblasti. Takováto dominance jediného druhu endofytické asociace je unikátní i ve srovnání se spektry endofytů známými z terestrického prostředí.

Námi sledovaná endofytická asociace p. Neptunovy je, co se mořských trav týče, první popsanou houbovou symbiózou tvořící charakteristické struktury. Dosud pozorované endofyty kolonizovaly kořeny mořských trav buď nesespecificky, nebo byly lokalizovány v určité části kořene, ovšem nikdy netvořily diferencované struktury porovnatelné se strukturami houbových endofytů terestrických rostlin.

Srovnáváním získaných sekvencí endofytických hub se známými sekvencemi v databázi GenBank jsme zjistili, že nejrozšířenější endofytická houba p. Neptunovy s největší pravděpodobností přísluší k dosud nepopsanému druhu houby v rámci čeledi Aigialaceae. Ostatní

druhy hub této čeledi jsou zpravidla halofilní houby porůstající nejrozličnější substráty v mořském prostředí, nejčastěji rozkládající se dřevo.

Zdá se, že v kořenech posidonie Neptunovy zcela převládá jediný taxon endofytické houby, kterým je melanizovaná houba s přeštrukturovanými hyfami identifikovaná jako *Pleosporales* sp. MV-2012. Podle výsledků izolačních experimentů je možné, že se ve skutečnosti jedná o dva velmi blízké příbuzné linie, ovšem i tak je Jediná další houba, možná několik blízkých linií. Situace, kdy se v kořenech hostitelských rostlin vyskytují téměř výlučně 2 taxony endofytických hub, je neobvyklá. V terestrických, ale i ostatních vodních ekosystémech je běžným jevem, že se v kořenech jediné rostliny vyskytují až desítky různých druhů endofytů. V rámci rozsáhlých areálů o rozloze stovek tisíc kilometrů čtverečních pak bývají komunity endofytických hub často značně variabilní.

Nízké druhové variabilitě endofytů pravděpodobně nahrává relativně vyšší homogenita prostředí mořského dna ve srovnání se stavem na souši. Přesto se však podmínky, ve kterých rostou posidonie, v některých faktorech do určité míry liší. V rámci Středozemního moře existují rozdíly v teplotě i sezónních rozdílech teplot, od relativně chladnějších oblastí severního Jadranu, francouzského pobřeží a východního Egejského moře po jižní pobřeží Turecka nebo jihovýchod Itálie. Dalším takovým faktorem může být salinita mořské vody, která ve Středomoří obecně roste od severozápadu k jihovýchodu.

Získané poznatky byly publikovány celkem ve 4 článcích:

Objev symbiózy v kořenech p. Neptunovy, morfologie – Vohník a kol. 2015

Izolace houbových endofytů v SZ Středomoří, determinace taxonomické příslušnosti – Vohník a kol. 2016

Systematická izolace houbových endofytů na několika lokalitách ve středním Chorvatsku, determinace taxonomické příslušnosti, pyrosekvenace z kořenů posidonie – Vohník a kol. 2017

Vztah mezi výskytem a četností kořenového vlášení a houbovou kolonizací kořenů semenáčků a dospělých rostlin p. Neptunovy – Borovec a Vohník 2018

2 Cíle práce

Všeobecným cílem mé práce je rozšíření znalostí o asociacích kořenů mořských trav a endofytických hub. V návaznosti na svou bakalářskou i diplomovou práci bych se chtěl detailněji zaměřit na endofyty v kořenech středomořské trávy posidonie Neptunovy. V rámci tohoto směru studia bylo mými hlavními cíli:

1. Zmapovat rozšíření symbiózy tmavé septované houby v kořenech p. Neptunovy v dalších námi dosud neprobádaných oblastech
2. Porovnat spektra hub kolonizujících kořeny p. Neptunovy z několika regionů Středoziemního moře, pokusit se zjistit případné trendy ve výskytu jednotlivých hub
3. Zjistit vztah mezi výskytem a četností kořenového vlášení a houbovou kolonizací kořenů p. Neptunovy

3 Literární přehled

Houby jsou jednou z hlavních linií organismů na zemi, a zároveň jednou z nejvíce diverzifikovaných. Předpokládá se, že počet druhů hub přibližně odpovídá počtu druhů živočichů a výrazně překračuje počet druhů rostlin (Blackwell 2011). Dosud je popsáno pouze přes 100 tisíc druhů hub, ačkoli odhady počtu hovoří o až několika milionech dosud neznámých druhů. (Hawksworth a Rossman 1997, Hawksworth 2001, Kirk a kol. 2008, Blackwell 2011). Houby se vyskytují prakticky ve všech biotopech na Zemi, jsou známy i z prostředí se značně extrémními podmínkami, jako jsou pouště, polární oblasti a zasolené či lidskou činností kontaminované oblasti (např. Schneider a kol. 2013). Značné bohatství biodiverzity hub leží i v mořském prostředí. V současné době je známo jen několik stovek druhů obligátně mořských hub, i když jejich počet je pravděpodobně mnohonásobně vyšší, odhady hovoří o více než 10 tisících druhů (Jones 2011). Všude, kde se vyskytují, jsou houby nedílnou součástí ekosystémů a tvoří symbiotické asociace s celou řadou organismů. Rostlinné kořeny hostí velký počet endofytických hub v širokém spektru asociací od mutualistických přes neutrální endofytické až po saprotrófské a parazitické houby (Vandenkoornhuyse a kol. 2002).

Spojením mutualistických hub a kořenů rostlin vznikají charakteristické struktury známé jako mykorhizy, podle nichž jsou tyto asociace nazývány mykorhizní symbiózy (Brundrett 2004). Tato symbióza mezi houbami je velmi rozšířená – přibližně 80 % druhů a dokonce 92 % čeledí rostlin tvoří mykorhizní symbiózu (Wang a Qiu 2006, Brundrett 2009). Při navazování interakce mezi kořeny a symbiotickými organismy v půdě, jakými jsou mykorhizní houby nebo bakterie hrají důležitou roli kořenové exudáty (Peterson a Farquhar 1996, Van Loon a Bakker 2003).

Mykorhizní houby hrají zásadní roli v příjmu minerálních živin ze substrátu, Extraradikální mycelium mykorhizních hub proniká daleko do půdy a je v těsném kontaktu s podstatně větším objemem půdy, než kořenové systémy rostlin. Souhrn půdy, která je v kontaktu a pod vlivem kořenů i hub, se nazývá mykorhizosféra (Linderman 1988). Ve většině terestrických ekosystémů jsou živiny vázány v nerozpustných formách a jsou tudíž pro rostliny nedostupné. Pro mykorhizní houby však dokážou tyto živiny získat, protože jsou podobně jako další půdní houby vybaveny aparátem pro tvorbu specifických enzymů (Smith a Read 2008).

Mykorhizní houby dále představují ochranu proti patogenům, zlepšují vodní hospodaření rostliny a mohou zvyšovat toleranci rostliny vůči biotickým i abiotickým stresovým faktorům (např. Ruiz-Lozano a kol. 1995; Hussain a kol. 2011). Zdá se, že spolupráce s houbami umožnila přechod rostlin na souš a napomohla vývoji prvních cévnatých rostlin (Remy a kol. 1994; Redecker a kol. 2000; Brundrett 2002) a že mykorhiza ve smyslu provázanosti struktur kořene a houby je vlastně

evolučně původním stavem. Mykorhizy zásadně ovlivnily rovněž vznik a vývoj kořene jako takového a měly zásadní vliv na jeho anatomii a morfologii (Selosse a Le Tacon 1998; Brundrett 2002). Různé linie rostlin v průběhu fylogeneze adoptovaly jiné formy příjmu živin a sekundárně u nich došlo ke zániku mykorhizních asociací. Takovými skupinami jsou například rostliny parazitické, masožravky nebo rostliny tvořící takzvané proteoidní kořeny – velmi hustě rostoucí a nahloučené kořeny původně popsané u čeledi proteovitých (Proteaceae). Další alternativou je tvorba velmi husté sítě kořenového vlášení, například u masožravých rostlin (Brundrett 2009).

Další skupinou rostlin, jejíž zástupci jsou často schopni se obejít bez mykorhizních symbióz, jsou trvale ponořené vodní rostliny. Ty jsou zpravidla schopné získávat živiny z okolní vody prostřednictvím listů (Madsen a Cedergreen 2002). Nedostatek rozpuštěných živin v oligotrofních vodách však nutí vodní rostliny k příjmu živin ze substrátu (Raven 1981). Ke zvýšení příjmu živin ze substrátu mnoha terestrickým rostlinám slouží kořenové vlášení (Shannon 1953; Bristow a Whitcombe 1971; Wilson a Bennett 2007) a některé skupiny sladkovodních rostlin z oligotrofních vodstev mohou tvořit i arbuskulární mykorhizu (Beck-Nielsen a Madsen 2001; Andersen a Andersen 2006; Šraj-Kržič a kol. 2006; Sudová a kol. 2011). V případě výskytu mykorhizních hub a kořenového vlášení u jediného rostlinného druhu dochází i v případě vodních rostlin k negativní korelaci (Sondergaard a Laegaard 1977; Farmer 1985).

Kromě mykorhizních hub kořeny naprosté většiny terestrických rostlin hostí nejrozumnější typy houbových endofytů. Tyto endofytické asociace jsou podle knižní definice určeny tím, že se nespécializují na kolonizaci určitých pletiv kořene, tvoří mykorhizu a zároveň nevykazují žádné typické symptomy houbové nákazy (Wilson 1995; Rodriguez a kol. 2009). Ve skutečnosti však mnoho endofytů ovlivňuje svého hostitele ať už v pozitivním, nebo negativním smyslu (Jumpponen a Trappe 1998; Newsham 2011; Mayerhofer a kol. 2013; Lukešová a kol. 2015). V rámci komunit endofytických hub v kořenech terestrických rostlin často převažují takzvané tmavé přehrádkované endofyty (dark septate endophytes, DSE), houby, které jsou tvořeny melanizovanými přehrádkovanými hyfami a vnitrobuněčnými mikrosklerocii (Jumpponen a Trappe 1998).

Na rozdíl od terestrických i sladkovodních rostlin se zdá, že mořské trávy tvoří mykorhizu (Nielsen a kol. 1999; Shoemaker a Wyllie-Echeverria 2013; Supaphon a kol. 2014), ale podobně jako ostatní rostliny asociují s endofytickými houbami. Endofytické houby rostou v rostlinných pletivech, které často kolonizují jen velmi nezřetelně a obtížně pozorovatelně. Na rozdíl od mykorhiz tvoří žádné specifické a pro sebe charakteristické struktury (Wilson 1995; Rodriguez a kol. 2009) a na styku houbových a rostlinných tkání nevzniká rozhraní sloužící k výměně látek mezi oběma symbionty (Lukešová a kol. 2015).

Většina endofytických hub zaznamenaných v kořenech mořských trav se řadila k běžným

ubikvitním rodům anamorfních vřeckovýtrusých hub jako *Penicillium*, *Aspergillus* nebo *Cladosporium*, které se vyskytují endofyticky i v terestrických rostlinách (Panno a kol. 2013). Byl však pozorován i endofytický výskyt typicky mořských hub jako například *Halotthia* nebo *Corollospora* (Cuomo a kol. 1985). Ekologie, funkce a význam těchto endofytických asociací ovšem prakticky není znám.

K systematickému průzkumu těchto houbových asociací na úrovni morfologické ani anatomické dosud prakticky nedocházelo, stejně tak ke kultivaci hub získaných z kořenů mořských trav. Převážná většina studií spekter endofytických hub v kořenech mořských trav se zaměřovala na izolaci houbové DNA ze vzorků rostlinných pletiv (Panno a kol. 2013) Při těchto experimentech je však prakticky nemožné rozlišit mezi endofyty a houbami, které se vyskytují pouze epifyticky a do rostlinných pletiv nepronikají.

Mořské trávy

Jedinou skupinou cévnatých rostlin, která celý svůj život tráví pod mořskou hladinou, jsou takzvané mořské trávy. V mořích tropických, subtropických a mírných podnebných pásmech se vyskytuje více než 40 druhů mořských trav, které se řadí do 4 čeledí (Posidoniaceae, Cymodoceaceae, Zosteraceae a Hydrocharitaceae) v rámci řádu žabníkotvarých (Alismatales), které spojuje obdobná životní strategie. O přesném počtu druhů nepanuje v odborné literatuře jednotný názor, protože některé druhy, které se vyskytují spíše v oblastech s nižší salinitou a prakticky brakickou vodou, nejsou někdy mezi mořské trávy zařazovány. Těžištěm biodiverzity mořských trav je indomalajská oblast, pobřeží Austrálie, Karibská oblast a v menší míře i Rudé moře. U pobřeží některých indonéských ostrovů se na rozloze několika desítek kilometrů vyskytuje více než 10 druhů mořských trav. Naproti tomu druhová skladba těchto mořských rostlin u pobřeží Evropy je podstatně chudší. Ve Středozezemním moři roste pouhých 5 druhů mořských trav, z nichž jeden je nepůvodní. Dno Černého moře a vodstev omývajících západ a sever Evropy porůstají pouze 1-2 druhy mořských trav (Hemminga a Duarte 2000; Green a Short 2003).

Posidonie Neptunova (*Posidonia oceanica* (L.) Delile) je jedním z devíti druhů monotypického rodu posidonie z čeledi posidoniovité (Posidoniaceae), která patří do řádu žabníkotvarých (Alismatales). Osm příslušníků rodu posidonie roste v mělkých mořích při pobřeží jihozápadní a jihovýchodní Austrálie, zatímco p. Neptunova, jediný zástupce rodu vyskytující se na severní polokouli, je endemitem Středozezemního moře. Vyskytuje se v mělkých mořích od mořské hladiny až do hloubky přibližně 40 metrů (Green a Short 2003). Tvoří souvislé porosty známé jako mořské louky, které jsou místy i velmi rozsáhlé (dosahují rozlohy i několika desítek kilometrů

čtverečních) a mohou přetrvat až několik tisíc let (Arnaud-Haond a kol. 2012).

Ve zpravidla oligotrofním prostředí Středozemního moře je nejčastějším limitujícím prvkem fosfor, těsně následovaný dusíkem (Estrada 1996). Za těchto podmínek je příjem živin prostřednictvím listu nedostatečný pro výživu mořských trav a jejich kompletní vývoj (Lepoint a kol. 2004). Proto tvoří posidonie rozsáhlé a bohatě větvené kořenové systémy, které jsou pro výživu rostliny zásadní (Belzunce a kol. 2008a).

Posidonie Neptunova porůstá zpravidla oblasti mořského dna s písčítým či kamenitým substrátem. Postupně jsou tyto minerální substráty překryty kompaktním materiálem zvaným *matte*, které je tvořeno rozkládajícími se nadzemními částmi posidonie spolu s živými i rozkládajícími se kořeny smíšenými s původním substrátem mořského dna. Vrstva *matte* může dosahovat až několikametrové mocnosti. Rovněž slouží jako významný zdroj uhlíku pro celý ekosystém mořské louky. V této formě – vázaný v organických látkách – je uhlík dostupný bakteriím a houbám, nikoli však rostlinám (Somaschini a kol. 1994; Borg a kol. 2006).

Posidonie Neptunova je velmi významným elementem biotopu mořského dna a tvoří základ ekosystému mořské louky. Je důležitým producentem a zároveň i úložištěm organického uhlíku (Fourquaran a kol. 2012). Stojí u základů potravního řetězce a ve Středomoří je nezastupitelným producentem biomasy a kyslíku a v neposlední řadě tvoří symbiotické asociace s celou řadou organismů. Porosty posidonie poskytují úkryt živočichům z vodního sloupce. Listy posidonie poskytují substrát řasám a bakteriím, které tvoří epifytické povlaky. Bakterie tvoří i endofytické symbiózy, které hostitelské rostlině slouží mimo jiné k zesnadnění látkové výměny a jako zdroj sekundárních metabolitů. S žijícími i již uhynulými rostlinami interagují rovněž houby (Cuomo a kol. 1985; Sakayaroj a kol. 2010; Panno a kol. 2013).

Výživa většiny cévnatých rostlin závisí na příjmu živin prostřednictvím kořenů. Kořeny získávají minerální látky rozpuštěné ve vodném roztoku z takzvané rhizosféry – relativně malého objemu půdy, který obklopuje kořeny a je s nimi v bezprostředním kontaktu, do vzdálenosti cca. 1-2 mm. Za účelem usnadnění příjmu živin vytváří mnoho rostlin kořenové vlášení. To je tvořeno kořenovými vlásky, jednobuněčnými protáhlými strukturami rhizodermálního původu. Kořenové vlášení značně zvětšuje povrch kořenů, rozšiřuje objem rhizosféry a zásadně zvyšuje schopnost absorbce a příjmu živin (Gilroy a Jones 2000). Příjmu živin prostřednictvím kořenového vlášení mohou napomáhat i kořenové exudáty (Weston 2003; Yan a kol. 2004).

Kořeny jsou pro rostlinu zcela zásadní i z mnoha jiných důvodů – ukotvují ji v substrátu, což je funkce zásadní zejména pro rostliny žijící ve vodním prostředí. U některých rostlin slouží jako úložiště živin a zdroj i sink sekundárních metabolitů. U mnohých rostlin umožňují nepohlavní rozmnožování a slouží i k přivádění vzduchu do rhizosféry (Waisel a kol. 2002; De Kroon a Visser

2003).

Co se mořských trav týče, jsou rovněž schopné přijímat živiny prostřednictvím listů (McRoy a Barsdate 1970; Pedersen a Borum 1992; Khan a Belik 1995; Terrados a Williams 1997), ale u většiny druhů, zejména u těch, jež rostou v oligotrofních vodách, má zásadní význam transport ze substrátu prostřednictvím kořenů (Brix a Lyngby 1985; Stapel a kol. 1996, Lepoint a kol. 2002). Kořeny většiny druhů mořských trav produkuje kořenové vlášení. U terestrických rostlin tyto struktury často slouží ke zvýšení příjmu živin ze substrátu (např. Gilroy a Jones 2000). U některých druhů kořenové vlásky napomáhají k uchycení v substrátu. Pak bývají vybaveny různými adaptacemi, které zvyšují sílu uchycení. Například vlásky orchidejí z podtribu *Spiranthinae* mají zesílenou buněčnou stěnu, která zvyšuje jejich mechanickou odolnost. Toto zesílení se vizuálně projevuje spirálním ztlustěním buněčné stěny. Při degradaci buněk kořenového vlášení pak právě ztlustlé spirálovité buněčné stěny přetrvávají a i nadále zvyšují přilnavost rostliny k substrátu (Bernal a kol. 2015). Obdobnou funkci má i “lopatkovitě tvarované” a “spirálně stočené” kořenové vlášení břečťanu (*Hedera helix*) (Melzer a kol. 2010; Melzer a kol. 2011).

Role kořenového vlášení v mořském prostředí není kompletně prozkoumána. Kořenové vlásky mohou přilnout k částčkám substrátu a tím zvýšit sílu uchycení rostliny v substrátu, zejména v raných fázích vývoje semenáčku. Právě v tomto období jsou mladé rostlinky nejvíce ohroženy jednak pravidelným pohybem mořského sloupce, který s sebou zároveň strhává svrchní vrstvu substrátu, a zejména silným pohybem vody při bouřích, které jsou schopné zdecimovat celé populace semenáčků (Soong a kol. 2013; Badalamenti a kol. 2015). Výzkum australských druhů *Halophila ovalis* a *Posidonia coriacea* ukázal, že ke zvýšenému výskytu a růstu kořenového vlášení dochází při nízkých koncentracích dusíku v substrátu, což naznačuje roli vlášení ve výživě rostlin, podobně jako u terestrických rostlin.

Na rozdíl od mnoha ostatních druhů mořských trav byla posidonie Neptunova dlouho známá jako druh, který kořenové vlášení netvoří (např. Kuo a McComb 1998; Nielsen a kol. 1999). Novější studie odhalily výskyt těchto struktur u semenáčků (Belzunce a kol. 2008b) i dospělých jedinců (Torta a kol. 2015), i když jen poměrně řídký. V nedávné době pozorovali Badalamenti a kol. (2015) u semenáčků posidonie poměrně hustý výskyt kořenového vlášení. Jednotlivé vlásky tvoří apikální struktury, které relativně velkou silou lnou k částčkám substrátu. Kořenové vlášení posidonii zjevně slouží jako adaptace k přichycení k substrátu.

4 Materiál a metody

Sběr vzorků

Místa s výskytem posidonie Neptunovy byla v první řadě lokalizována s pomocí odborných publikací, jejichž autoři prováděli odběry této rostliny (např. Pasqualini a kol. 1998; Torta a kol. 2015). Ke zjištění přesného umístění porostů mořské trávy jsme dále využívali satelitních map předpokládaných nalezišť. Na těchto mapách se mořské louky jeví jako tmavější oblasti v porovnání s okolním pískem a v porovnání se skalami, popřípadě kamenitými částmi mořského dna je lze odlišit jiným odstínem zbarvení. Přímou na místě lze pak výskyt mořských trav lokalizovat pozorováním výskytu zbytků rostlin na pobřeží.

Posidonie Neptunova se na lokalitách, kde jsme prováděli odběry, vyskytovala v hloubkách od 0 do 40 metrů. Vzorky kořenů mořských trav jsme získávali s využitím přístrojového potápění. Nejvíce se nám osvědčilo trhání kořenů ze substrátu rukama, bez využití jakýchkoli nástrojů – z písčitéjších substrátů jsme takto byli schopni získat i celé kořenové soustavy. Provedli jsme i několik pokusů odběrů s využitím potápěčského nože, ale tento postup se neukázal být lepším. Pokud to na dané lokalitě bylo možné, sbírali jsme kořeny z různých genetů a z různých mikrolokalit v rámci daného místa. Vždy jsme získali vzorky z alespoň 5 různých rostlin, a, pokud možno, z 5 alespoň několik desítek metrů od sebe vzdálených mikrolokalit. Přehled všech lokalit, kde jsme provedli odběr vzorků p. Neptunovy, viz. Tab. 1.

Vzorky kořenů jsme přímo během ponoru umísťovali do 50ml plastových epruvet, které pojmu dostatek materiálu a zároveň jsou velmi praktické pro převoz kořenů ze zahraničí, a to i při leteckém způsobu přepravy. Při odběru starších vzorků jsme naplnili vždy jen jedinou epruvetu, zato u novějších vzorků z let 2015 a 2016 jsme rozšířili rozsah odběrů tak, aby byly vzorky z každé z 5 mikrolokalit umístěny do jiné epruvety. Ihned po návratu na břeh jsme do mořské vody, v níž byl získaný rostlinný materiál uložen, přimíchali ethanol a připravili cca. 40-50% roztok, ve kterém byly vzorky uchovávány při převozu i po návratu do laboratoře. V případě potřeby jsme starší nebo nedostatečně silné roztoky ethanolu v laboratoři vyměnili za nové. Celé semenáčky jsme umísťovali do pečlivě vymytých plastových lahví, dále jsme do transportního média přidali ethanol a po návratu do laboratoře jsme semenáčky přemístili do půllitrových nebo litrových lahví vhodnějších k dlouhodobému uskladnění. V laboratoři jsme vzorky uložili do lednice a skladovali při teplotě 5-8 °C. Kořeny, které byly určeny pro izolační experimenty, jsme neumísťovali do ethanolu, ale jejich segmenty na kultivační média umísťovali rovnou, pokud možno ještě téhož dne, abychom zamezili

zbytečné kontaminaci z prodlení.

Mikroskopická pozorování

Náhodně vybrané kořeny byly nařezány na zhruba 5 milimetrů dlouhé segmenty. Ty byly poté s využitím bezové duše nařezány žiletkou, popřípadě na ručním mikrotomu. Veškerá pozorování stereoskopickým mikroskopem byla provedena na přístroji Olympus SZX12. K mikroskopickému pozorování nám sloužil přístroj Olympus BX60 vybavený diferenciálním interferenčním kontrastem (DIC). Vzorky určené k fotografování jsme nejdříve zkoumali pod stereomikroskopem. Výskyt tmavé symbiotické houby na povrchu kořene zpravidla způsoboval dobře viditelné tmavší zbarvení kořene, a tak jsme k přípravě řezů vybírali zejména tmavší kořeny.

Preparáty pro skenovací elektronovou mikroskopii byly připraveny s využitím ručního řezu v bezové duši, popřípadě ručního mikrotomu. Dále byly zpracovány, pokoveny a připraveny k mikroskopování v Mikroskopické laboratoři Oddělení mykorrhizních symbióz Botanického ústavu AV ČR, v. v. i. Snímky ze skenové elektronové mikroskopie byly pořízeny na skenovacím elektronovém mikroskopu FEI Quanta 200 v módu Olympus ESEM při nízkých teplotách (-12°C to -3°C). Mikroskopická pozorování kořenů byla využita v článku Vohník a kol. (2015) (Tab. 2).

Vzorky z Černé Hory určené na studii Borovec a Vohník (2018)

Pro tuto studii jsme využili vzorků získaných z Černé Hory (Tab. 2). Celkem jsme získali 5 souborů vzorků – ze 2 lokalit dospělé rostliny z obvyklého písčitého substrátu na kamenitém podkladu, 1 vzorek rostliny rostoucí jemnějšího jílovitého substrátu z lokality Sveti Stefan, mladé, nejvýše dvouleté semenáčky posidonie na lokalitě Sutomore a konečně starší, již několikaleté semenáčky na lokalitě Trsteno Beach. Z každého souboru vzorků bylo náhodně vybráno 30 segmentů kořenů o délce přibližně 1 centimetr. Tyto segmenty byly prostudovány pod stereomikroskopem Olympus SZX12 a byla spočítána hustota kořenového vlášení na milimetr délky kořene.

Z každého tohoto segmentu kořene byly následně s využitím řezu preparátu v bezové duši žiletkou připraveny příčné řezy. Pod mikroskopem Olympus BX60 vybaveným aparaturou pro diferenciální interferenční kontrast (DIC) byly kořeny prostudovány a následně bylo spočítáno procento kolonizace kořenů endofytickými houbami. Stanovili jsme kolonizaci kořenů jednotlivými

houbovými strukturami a následně i celkovou kolonizací. Kolonizace povrchu kořene jsme určili s využitím průsečikové metody (McGonigle a kol. 1990) modifikované pro naše potřeby – namísto zcela náhodného určení míst kořene, ve kterých jsme zjišťovali přítomnost kořene, jsme každou rhizodermální buňkou provedli pomyslný průsečík s povrchem kořene a v nich jsme sledovali přítomnost houbových struktur. Vlastní hodnota kolonizace byla určena jako počet rhizodermálních buněk s výskytem hub na povrchu. V podstatě obdobně jsme stanovili i výskyt vnitrokořenových hyf a mikrosklerocií – jako počet hypodermálních buněk se zjištěnou přítomností té či oné struktury. Pro účel zjištění celkové kolonizace jsme pomyslné průsečíky z povrchu vedli i do prostoru hypodermis, a sledovali přítomnost libovolných houbových struktur. Pokud se vyskytl alespoň jedna forma symbiotické houby, daný průsečík byl zaznamenán co do výskytu hub jako pozitivní. Podílem segmentů kořene s výskytem houby na celém povrchu kořene jsme následně číselně vyjádřili procento kolonizace.

Výsledky jsme rozdělili do dvou podskupin – první obsahovala srovnání mladých a starších semenáčků a dospělých rostlin z nedaleké lokality, druhá pak srovnání dospělců z písčitého a jílovitého substrátu. Homogenita rozptylu obou vzorků byla otestována s využitím Levenova testu, normalita rozdělení pak s využitím Shapiro-Wilkova testu. Průměrné hodnoty hustoty vlášení a houbové kolonizace podskupiny písek-jíl byly porovnány s využitím Kruskal-Wallisova testu a post-hoc Nemenyiho testu. Některé kategorie v podskupině semenáčky-dospělci obsahovaly samé nulové hodnoty, a proto jsme odlišnost hustoty vlášení a houbové kolonizace otestovali vhodnějším zobecněným lineárním modelem (GLIM).

Dále jsme srovnávali průměrnou četnost výskytu charakteristických apikálních struktur kořenového vlášení a průměrnou hustotou kořenového vlášení s apikálními strukturami mezi jednotlivými skupinami rostlin. Všechny 4 skupiny, u kterých byl zaznamenán výskyt kořenových vlásků, byly analyzovány v jediném souboru dat za využití stejných metod jako podskupina písek-jíl.

Veškeré statistické analýzy byly provedeny v softwaru R verze 3.3.2. Pro výpočet Nemenyiho testu jsme využili balíčku PMCMR (Pohlert 2014).

Izolace a determinace endofytických hub

Pro kultivaci hub ve všech studiích zabývajících se izolací endofytů jsme používali médium Potato dextrose agar (PDA; HiMedia Pvt. Ltd., Indie). Jedná se o běžné médium využívané pro kultivaci hub i bakterií. Pro potřeby kultivace hub z kořenů mořského prostředí jsme přípravu modifikovali přidáním 3,5 gramu chloridu sodného na litr média. Toto médium se již osvědčilo při

našich předchozích experimentech. Abychom zabránili kontaminacím bakteriemi, do média jsme přidali sodnou sůl Novobiocin (50 mg/L; Sigma-Aldrich, Německo). Vzorky získané v Boraku v Chorvatsku jsme kultivovali na celkem 4 různých médiích, a to PDA (potato dextrose agar), GPYA (glucose peptone yeast extract agar; GPYA: 2% glukóza, 1% pepton, 2% agar a 0.5% extrakt z kvasinek), MEA (malt extract agar; Ottow a Glathe 1968) a MMN (modified Melin-Norkrans; Marx 1969). Všechna tato média jsme připravovali ve dvou různých variantách – jednak s přidavkem směsi sušených a drcených kořenů, oddenků a listů posidonie Neptunovy, a dále podle protokolu bez jakýchkoli příměsí. Médium MMN pak bylo využito i ve studii Vohník a kol. (2016)

Pro práci ve sterilním prostředí přímo v místě sběru jsme využili přenosný flowbox, v němž byly náhodně vybrané kořeny posidonie nařezány na cca. půlcentimetrové segmenty. Ty byly následně povrchově sterilizovány 10% roztokem bělicího prostředku SAVO, za účelem zbavení se zbytků přípravku omyty sterilizovanou vodou a po osušení umístěny na kultivační médium. Abychom zabránili přílišnému vysychání a rovněž omezili přístup potenciálních kontaminantů, spoje mezi svrchními a spodními částmi Petriho misek jsme zakryli částečně propustnou páskou Parafilm. Izoláty byly uskladněny při pokojové teplotě v temnotě a průběžně byly kontrolovány pro případ výskytu kontaminace.

Z kultur vypěstovaných hub jsme s využitím Sigma-Aldrich RedEx-N-Amp kitu izolovali DNA. Nukleová kyselina byla amplifikována s pomocí RedEx multi mixu podle protokolu uvedeného výrobcem. Amplifikovali jsme ribozomální DNA, zejména region ITS1-5,8S-ITS2, méně pak oblast LSU a SSU. Následně byla získaná DNA sekvenována s využitím služby Macrogen Inc. Po několika měsících jsme ukončili fázi kultivace, provedli finální sčítání vzorků a následně umístili Petriho misky do lednice, kde byly nadále skladovány při teplotě 5-8 °C.

Amplifikaci houbové DNA jsme prováděli podle následujícího předpisu:

1x	94 °C	4 min
35x	94 °C	30 s
	55 °C	30 s
	72 °C	2 min
1x	72 °C	10 min
	4 °C	do odebrání vzorků ze cycleru

Pro přípravu gelu pro elektroforézu jsme využívali 1,5% roztoku agarózy v pufru TAE, do gelu jsme dle objemu gelu přidali 1-2 ul ethidium bromidu. Samotná elektroforéza probíhala po dobu 20 minut při napětí 250 V a proudu cca. 300 mA

Laserová mikrodisekce

Pro laserovou mikrodisekci byly vybrány vzorky pocházející z lokalit na SZ Sicílie, konkrétně San Vito lo Capo 1 a 2 (IT-78 a IT-79) a Trabia (IT-80). V rámci nasbíraného materiálu jsme se zaměřili na mladší zdravě vypadající a tmavěji zabarvené kořeny, u kterých byla podle našich dosavadních znalostí vyšší šance výskytu endofytické houby. S využitím ručního mikrotomu jsme připravili tenké řezy, které jsme následně prohlédli pod mikroskopem a vybrali jsme řezy s velkým množstvím endofytických hub. Vybrané řezy byly přilepeny na podložní “skla” s folii. Tato skla byla umístěna na pracovní desku mikroskopu vybaveného laserem pro mikrodisekci. Z řezů jsme s využitím laseru disektovali skupiny cca. 5-10 buněk, jež obsahovaly viditelné houbové struktury. Jako referenci jsme použili buňky, které houbami kolonizovány nebyly. DNA vzorků jsme amplifikovali s využitím Phire Plant Direct PCR kitu podle předpisu dodaného výrobcem. Provedli jsme nested PCR v regionu rDNA ITS1-5,8S-ITS2 s využitím primerových párů LR0R-LR5 v prvním běhu a ITS1F-ITS4 v druhém běhu.

5 Výsledky

V kořenech mořské trávy posidonie Neptunovy získané z lokalit ve Španělsku, Francii, SZ Itálii a J Chorvatsku jsme zjistili přítomnost jediného typu endofytických hub. Jednalo se o symbionta tvořícího tmavé melanizované hyfy. Pozorovali jsme výskyt těchto hub na povrchu kořene, uvnitř kořene, ale vně buněk, i v buňkách kořene. Na povrchu kořene jsme zjistili výskyt jednotlivých hyf jednotlivých hyf i téměř souvislého pokryvu hyfami tvořícími pláště. Někdy dokonce tvořily sítě připomínající labyrint. Houby vstupovaly do kořene nejčastěji prostorem mezi jednotlivými buňkami rhizodermis. Vnitrokořenové hyfy se vyskytovaly převážně v hypodermis, vrstvě buněk umístěné pod rhizodermis morfologicky se odlišující od zbytku primární kůry. Naopak buňky rhizodermis zpravidla houbou kolonizovány nebyly. Hyfy uvnitř kořene se značně lišily ve své velikosti; zatímco běžně byly relativně tenké, na rozhraní mezi jednotlivými buňkami se často rozšiřovaly a tvořily struktury připomínající apresoria. Kromě hyf prorůstajících kořenem jsme pozorovali i vnitrobuněčná mikrosklerocia. Endofyt kolonizoval jak živé, tak odumřelé buňky hypodermis. Dále do kořene však nikdy nevstupoval, výskyt houby ve středním válci jsme vůbec nezaznamenali (Obr. 1).

Endofytické houby se vyskytly v kořenech p. Neptunovy na všech zkoumaných lokalitách. Lišily se však v rozsahu a intenzitě kolonizace. Zatímco v intenzivně kolonizovaných kořenech houba často pokrývala celý povrch kořene a obsazovala prakticky kompletně vrstvu hypodermis včetně rozsáhlé tvorby mikrosklerocií, v případě řídkého výskytu se kolonizace omezovala na “zářezy” mezi rhizodermálními buňkami na povrchu kořene a hypodermální buňky nacházející se bezprostředně pod těmito zářezy. Na všech lokalitách odběru byly alespoň některé kořeny p. Neptunovy kolonizovány morfologicky touž tmavě zbarvenou septovanou houbou a na většině lokalit endofytické houby tvořily všechny charakteristické struktury.

Výjimku představovaly kořeny semenáčků získané v Černé Hoře a studované v rámci práce k publikaci Borovec a Vohník (2018). Mladé rostlinky zato tvořily bohaté kořenové vlášení, jen u zhruba 10 % kořenové vlásy nebyly přítomné. Na špičce některých kořenových vlásků se tvořily charakteristické apikální struktury, které sloužily k přilnutí k substrátu a zlepšovaly ukotvení rostliny na mořském dně. Buněčná stěna některých kořenových vlásků měla zřetelně spirálovitý tvar, po odtrhnutí z podkladu se jejich povrch zjevně rozvolnil, ale právě spirálovitá část buněčné stěny přetrvávala (Obr. 2). Dospělé rostliny z Černé hory byly kolonizované stejnou endofytickou houbou jako ostatní studované posidonie. Na rozdíl od dospělců z většiny ostatních lokalit jsme však na některých kořenech zaznamenali přítomnost kořenového vlášení. Rovněž některé vlásy dospělců tvořily charakteristické apikální struktury (Obr. 3).

Srovnání průměrných hodnot hustoty kořenového vlášení a endofytické kolonizace včetně jednotlivých houbových struktur je přehledně uvedeno v Tabulkách 3 (podskupina semenáčky – dospělci) a 4 (podskupina písek-jíl). Srovnání průměrné četnosti apikálních struktur a průměrné hustoty kořenového vlášení s apikálními strukturami je pak uvedeno v Tabulce 5.

Ve zkoumaných kořenech společně rostoucího druhu mořské trávy, *Cymodocea nodosa*, jsme nezaznamenali výskyt houbové asociace pozorované v p. Neptunově. Pozorovali jsme pouze řídký výskyt hyf v rhizodermálních buňkách a na povrchu kořene.

Pro izolaci hub z kořenů posidonie Neptunovy se nejlépe osvědčilo médium PDA s příměsí mořské soli, výrazně méně izolátů vyrostlo na médiu MMN. Z celkového počtu 880 segmentů kořene umístěných na médium jsme získali 177 izolátů hub. Na rozdíl od většiny izolačních pokusů jsme nezaznamenali růst žádných rychle rostoucích bakterií nebo hub.

Houbové izoláty získané během studie Vohník a kol. (2016) bylo možné rozdělit do 3 morfotypů – černý v počtu 160 izolátů, žlutý (16 izolátů) a okrový (1 izolát). Zatímco houby z kategorie žlutého a okrového morfotypu začaly růst relativně dříve a jejich vývoj byl rychlejší, houby černého morfotypu se objevovaly mnohem později, i po několika měsících, rostly pomaleji a dosahovaly zpravidla menší velikosti.

Ze všech izolátů byla úspěšně amplifikována a osekvenována DNA. Celkem byly zaznamenány 3 skupiny sekvencí, které odpovídaly izolovaným morfotypům. Okrový morfotyp byl identifikován jako *Fuscoporia torulosa* (Basidiomycota, Hymenochaetaceae), žlutý izolát pak jako *Lulworthiales* sp. MV-2012 (Ascomycota). Nejčastěji se vyskytující černý morfotyp byl označen jako *Pleosporales* sp. MV-2012 (Ascomycota). Podle databáze GenBank vykazovala sekvence této černé houby nejvyšší shodu s houbami z čeledi Aigialaceae, jako například *Rimora mangrovei* nebo *Fissuroma aggregata*. Podle analýz ribozomální DNA z regionu SSU a LSU je izolát *Pleosporales* sp. MV-2012 sesterským taxonem k rodu *Aigialus*.

V rámci studie ze středního Chorvatska Vohník a kol. (2017) jsme z celkového počtu 1280 povrchově sterilizovaných segmentů kořenů posidonie Neptunovy získali 430 kolonií hub. Houby bylo možné rozdělit na 2 morfotypy, a to černý a žlutý. Výrazně častějším byl černý morfotyp, který se vyskytl v 397 případech (přibližně 92 %). Tato houba se vyskytovala na všech lokalitách, vždy převažovala a na 3 místech se jednalo dokonce o jediný získaný morfotyp. Následně jsme prostřednictvím sekvenace a srovnání získaných sekvencí s údaji v databázi GenBank zjistili, že černý morfotyp je totožný s taxonem *Pleosporales* sp. MV-2012, který jsme zaznamenali již v předchozí studii ze severozápadního Středomoří. Rovněž taxonomická příslušnost žlutého morfotypu se shodovala s předchozí studií, jednalo se o *Lulworthiales* sp. MV-2012.

Prvotní výsledky izolačních experimentů Turecko I., Sicílie, Borak a Turecko II. (Tab. 2)

naznačují obdobné výsledky, jako v předchozích studiích – převládal černý morfortyp, který byl předběžně identifikován jako *Pleosporales* sp. MV-2012. Jeho dominance však nebyla tak výrazná, jak naznačovaly předchozí studie. Na části lokalit byl nejčastěji zaznamenaným izolátem žlutý morfortyp, který byl identifikován jako *Lulworthiales* sp. MV-2012, a na jedné sicilské a několika tureckých lokalitách dokonce převládaly jiné, v předchozích studiích se vůbec nevyskytující rychle rostoucí tmavé vláknité houby. Ukázalo se však, že DNA těchto hub lze jen velmi těžko amplifikovat. Několik málo získaných sekvencí z těchto hub pak příslušelo buď taxonu *Lulworthiales* sp. MV-2012 (v počtu 3) nebo běžným všudypřítomným anamorfním rodům vřeckovýtrusých hub *Penicillium* (1), *Alternaria* (2) a *Cladosporium* (1), jeden izolát byl identifikován jako stopkovýtrusá kvasinka *Cryptococcus*. Jeden pomalu rostoucí černý izolát viditelně odlišný od běžného černého morfortypu příslušel druhu *Corollospora maritima*, což je typicky mořská houba. Pro přehled morfortypů izolovaných při těchto experimentech viz. Tab. 6.

Experiment s laserovou mikrodisekcí bohužel nepřinesl požadované výsledky – s využitím speciálního amplifikačního kitu jsme na několikátý pokus sice získali několik sekvencí hub, ale jednalo se o kožní parazity lidí, žádné houby vyskytující se v mořském prostředí zaznamenány nebyly.

6 Diskuse

První studie zabývající se interakcí mezi kořeny mořských trav a houbami, které s nimi asociují, pocházejí z 80. let 20. století. Kuo a kol. (1981) zkoumali kořeny dvou australských druhů posidonie, *Posidonia australis* a *Posidonia sinuosa*. Prostřednictvím mikroskopického pozorování zjistili, že kořeny těchto mořských trav asociují s neidentifikovanými houbami. Podobně jako námi pozorovaný mykobiont p. Neptunovy, i tato houba se vyskytovala převážně v hypodermis kořene. Typ kolonizace, kdy endofyt často narušoval buněčnou stěnu a střední lamelu, poukazoval na jeho parazitický způsob života. García-Martínez a kol. (2005) studovali kolonizaci kořenů posidonie Neptunovy mikrobiální mikroflorou. S využitím elektronové mikroskopie pozorovali na jejich povrchu houbové hyfy, výskyt vnitrokořenových struktur však nezaznamenali.

Studie Panna a kol. (2013) se zabývala mykoflórą listů, rhizomů a kořenů p. Neptunovy i matte v porostech této mořské trávy. Ačkoli se jim podařilo na kultivační médium izolovat řadu druhů hub, žádnou systematickou kolonizaci pletiv zkoumané mořské trávy nezaznamenali. Torta a kol. (2015) podali zprávu o houbové kolonizaci kořenů p. Neptunovy z oblasti severozápadní Sicílie. Jimi pozorované přehrádkované hyfy a mikrosklerocia se zřejmě nevyznačovaly tmavou pigmentací typickou pro DSE.

DSE asociace sice zpravidla tvoří houbové struktury, jež by umožňovaly přenos látek mezi houbou a hostitelskou rostlinou (Peterson a kol. 2008), ale některé typy těchto endofytů na povrchu kořene formují Hartigovu síť, která je jinak charakteristickým znakem ektomykorhizních symbióz (Danielson a Visser 1990; O'Dell a kol. 1993; Fernando a Currah 1996; Münzenberger a kol. 2009; Lukešová a kol. 2015). Někteří autoři předpokládají, že husté parenchymatické sítě na povrchu kořene, známé též jako labyrintové pletivo DSE, které jsme poprvé na povrchu kořenů mořské trávy zaznamenali právě my, může sloužit obdobně jako Hartigova síť (O'Dell a kol. 1993; Fernando a Currah 1996; Wurzbürger a Bledsoe 2001; Vohník a Albrechtová 2011). Častý výskyt a u některých kořenů i velmi husté hybové sítě naznačují možnost přenosu látek prostřednictvím rozsáhlých styčných ploch mezi houbou a kořenem.

V hypodermis kořene p. Neptunovy se často tvořila mikrosklerocia, útvary, které se považují za fyziologicky neaktivní, neslouží k látkové výměně a zpravidla slouží k ukládání, popřípadě i k rozmnožování houby (Jumpponen a Trappe 1998; Yu a kol. 2001). Soudě podle morfologie symbiontů, tato asociace může být považována za klasickou endofytickou asociaci, nikoli za mykorhizu. K tomuto tvrzení přispívá i četný výskyt melanizovaných přehrádkovaných hyf a vnitrobuněčných mikrosklerocií, tedy struktur charakteristických pro DSE asociaci.

V kořenech druhého zkoumaného rostlinného druhu, mořské trávy *Cymodocea nodosa*, se

tato houbová asociace podle našeho pozorování vůbec nevyskytovala. Zdá se, že endofyt posidonie je, co se týče hostitelské rostliny, druhově specifický. Podobné případy jsou známy i u terestrických rostlin, kdy rostliny spolu se objevující na stejných lokalitách hostí různá spektra endofytických hub (Tejesvi a kol. 2013). Důvody této druhové specifity nejsou známy; může se jednat o různé interakce na molekulární úrovni, ale i o rozdíly ve stavbě kořenů obou druhů mořských trav. V kořenech p. Neptunovy endofytická houba kolonizuje převážně hypodermis, tlustostěnné pletivo, které se však u druhu *C. nodosa* nevyskytuje. Dalším znakem rostlin, který všeobecně omezuje kolonizaci endofytickými houbami, je tvorba bohatého kořenového vlášení. Suchozemské rostliny často využívají kořenových vlásků ke zvýšení příjmu živin ze substrátu (Gilroy a Jones 2000). Tyto kořenové struktury tak napomáhají při výživě a tím snižují potřebu asociace s mykorhizními houbami. A zatímco *C. nodosa* tvoří husté kořenové vlášení, u p. Neptunovy tyto struktury často chybí. Tento poznatek naznačuje, že by námi zkoumaná symbióza mohla sloužit při příjmu živin namísto kořenového vlášení, které tuto funkci zprostředkovává u některých dalších druhů mořských trav.

Autoři dřívějších studií, které se věnovaly studiu kořenových systémů posidonie Neptunovy, zaznamenali pouze velmi řídký výskyt kořenového vlášení (Kuo a McComb 1998; Torta a kol. 2015), nebo považovali tuto mořskou travu za druh zcela bez kořenových vlásků (Nielsen a kol. 1999; Haznedaroğlu a Akarsu 2009). Jen ojedinělý výskyt kořenových vlásků pozorovali u kořenů semenáčků p. Neptunovy kultivovaných in vitro na agarovém médiu Balestri a kol. (1998a) a Belzunce a kol. (2008b). Naproti tomu novější studie provedené Badalamentim a kol. (2015) a námi (Borovec a Vohník 2018) poukazují na častý výskyt kořenového vlášení u semenáčků rostoucích v přirozeném prostředí. Jednou z možných funkcí kořenového vlášení je lepší uchycení rostliny v substrátu. Pro přežití trvale ponořených druhů rostlin na mořském dně je zcela zásadní jejich schopnost odolat stálému pohybu vodního sloupce (Schutten a kol. 2005; Szmeja a Gałka 2008; Infantes 2011), takže by zvýšený výskyt kořenového vlášení v přirozeném prostředí znamenal zvýšenou šanci na záchranu při mimořádných disturbancích.

Pozorované apikální struktury odpovídají těm, jež ve své publikaci popsali Badalamenti a kol. (2015). Každý z těchto přilnavých kořenových vlásků zvyšuje sílu uchycení v substrátu až o 5,23 N, čímž výrazně přispívají k celkové stabilitě rostlin (Badalamenti a kol. 2015). Pokud je nám známo, druhá morfologická zvláštnost kořenového vlášení p. Neptunovy, spirální kořenové vlásy, dosud u tohoto druhu nebyly popsány. Podobně vypadající kořenové vlásy však byly zaznamenány u několika druhů orchidejí z podčeledi Spiranthinae (Leitgeb 1865; Bernal a kol. 2015). Autoři druhé jmenované studie předpokládají, že spirální kořenové vlášení zvyšuje sílu uchycení rostlin v substrátu a zároveň napomáhají získávání vody ze substrátu prostřednictvím kapilárního efektu

vznikajícímu mezi popraskanými částmi buněčné stěny kořenového vlásku. U mořských trav samozřejmě nelze předpokládat, že by kořenové vlásy pomáhaly se získáním vody. Naopak, jak jsem již uvedl, zvýšení síly uchycení v substrátu a mechanická odolnost kořenové soustavy mořských trav jsou nezbytné k úspěšnému růstu a přežití semenáčků. Předpokládáme, že u p. Neptunovy se nejedná o žádnou význačnou morfologickou zvláštnost, ale spíše o anatomický znak kořenových vlásků. Za běžného stavu jsou kořenové vlásy posidonie tubulární, podobně jako u naprosté většiny ostatních rostlin. Část buněčné stěny tvořící spirálu je však silnější, než zbytek vlásku. V případě disturbance, jakou může být zvýšené vlnění, bouře nebo činnost živočichů, dochází ke zvýšení tahu a celý kořenový vlasek takové napětí nemusí vydržet. Ztlustělé a zesílené spirálovité části buněčné stěny však nápor přečkají a i nadále poskytují ukotvení rostliny v substrátu, ačkoli se už vlastně jedná o umírající nebo mrtvé buňky.

Pokud je nám známo, význam kořenového vlášení ve výživě p. Neptunovy až dosud nebyl důsledně studován. Zdá se ale, že u semenáčků nemá nějaký zásadní význam, protože výživu mladých rostlinek obstarávají živiny uložené ve velkém a bohatém hypokotylu (Belzunce a kol. 2008a). Postupem času hlavní roli ve výživě přebírají kořeny (Belzunce a kol. 2008b). Snížená produkce kořenového vlášení u starších rostlin napovídá, že bohatě větvené kořenové soustavy dospělých posidonii přebírají hlavní roli i při kotvení v substrátu. Výskyt kořenového vlášení u dospělých rostlin rostoucích na atypickém jílovitém substrátu spolu s jejich nižší endofytickou kolonizací poukazuje na specifický vztah mezi oběma faktory a prostředím. Bez experimentální kultivace rostlin na odlišných substrátech však v tomto případě můžeme jen těžko určit, zda na jílovité půdě kořenové vlášení přebírá roli kořenů ve výživě

V průběhu našeho výzkumu vzorků ze severozápadního Středomoří se nám podařilo izolovat pouhé tři druhy houbových endofytů posidonie Neptunovy. Počet izolovaných hub tak přibližně odpovídá výsledkům, které získali Cuomo a kol. (1985) i Torta a kol. (2015). V obou zmíněných studiích byl zaznamenán jen jeden druh mykobionta. Naopak Panno a kol. (2013) identifikovali hned 14 druhů hub asociovaných s kořeny posidonie. Podobně jako Torta a kol. (2015) jsme zjistili přítomnost druhu *Lulworthiales* sp. MV-2012 s takřka identickou sekvencí ribozomální DNA z regionu ITS, jakou měla jimi zaznamenaná houba "*Lulwoana* sp.". Druh *Corollospora maritima*, jehož přítomnost v kořenech posidonie zjistili Cuomo a kol. (1985), na většině námi studovaných lokalit chyběl. Během studie na Sicílii se nám podařilo izolovat alespoň jeden exemplář tohoto druhu; v našich experimentech se však jednalo o vzácnost. V jednotlivých případech se nám podařilo izolovat i tři z hub, jejichž výskyt zjistili Panno a kol. (2013), a to houby rodu *Alternaria*, *Cladosporium* a *Penicillium*. Je však nutné zmínit, že mezi druhy izolovanými Pannem a kol. nebyl ani žádný z druhů, které detekovali Cuomo a kol. (1985). Panno a kol. (2013)

vysvětlovali absenci druhů získaných Cuomem a kol. (1985) odběrem vzorků v jiném ročním období, a to na jaře, oproti podzimním odběrům provedeným Cuomovým týmem. My však navrhuje, že tento rozpor by bylo možné vysvětlit i odlišnými metodami využitými při izolacích houbových endofytů p. Neptunovy. Panno a jeho kolegové své vzorky několikanásobně omývali sterilizovanou mořskou vodou a umisťovali kořeny do sterilní vody. Tato metoda však neslouží k dokonalému odstranění hub z povrchu kořene a vede k preferenčnímu růstu rychle rostoucích saprofytických druhů z povrchu kořene a hub původem z mořské vody, které neumožní nárůst skutečných endofytů (Sieber 2002). Právě ve vodním prostředí často dochází k jevu, kdy se spory hub nacházející se ve volné vodě přichytávají k pevným substrátům a zůstávají dormantní, ovšem životaschopné (Park 1974). Tomuto předpokladu nahrává i druhové spektrum hub, které získali Panno a kolektiv – jedná se z velké většiny běžné a široce rozšířené saprotrofní druhy z rodů jako *Acremonium* nebo *Penicillium*. Zdá se, že námi provedená přímá sterilizace povrchu kořenů p. Neptunovy vedla k odstranění těchto saprotrofů a tudíž jsme zjistili skutečně endofytické druhy v kořenech zkoumané mořské trávy. Oproti našim zjištěním z kořenů posidonie zjistili Shoemaker a Wyllie-Echeverria (2013) v rhizomech tří druhů mořských trav mírného pásu z Tichého oceánu přítomnost 36 druhů hub, a to převážně saprofytů a parazitů jako *Aspergillus*, *Cylindrocarpon*, *Penicillium* a *Trichoderma*, přestože kořeny povrchově sterilizovali s využitím chlornanu sodného.

Na většině lokalit byl zcela převažujícím izolátem z kořenů p. Neptunovy druh z řádu Pleosporales, a to Pleosporales sp. MV-2012. O výskytu této houby nebyla před naším výzkumem publikována žádná práce, ačkoli se studiem endofytů posidonie zabývalo již několik studií. Nezaznamenali ji dokonce ani Torta a kol. (2015), přestože použili pro svou práci velmi podobný předpis izolace a zjistili přítomnost houby "*Lulwoana* sp.", která velmi pravděpodobně přísluší stejnému druhu jako námi zjištěná *Lulworthiales* sp. MV-2012, tedy námi druhá nejčastěji izolovaná houba. Pro tuto skutečnost se nabízela dvě možná vysvětlení. Bylo možné, že houba na jimi zkoumaných lokalitách prostě nebyla přítomná, nebo kořeny posidonie kolonizovala jen velmi řídce, jak mohlo ostatně být případem i na dvou lokalitách, kde jsme druh Pleosporales sp. MV-2012 nezaznamenali. Výzkumem na Sicílii, kde jsme získali vzorky na stejných místech, na jakých pracovali Torta a kol. (2015), jsme však dokázali, že endofyt Pleosporales sp. MV-2012 se vyskytuje i zde. Zaznamenali jsme výskyt jeho charakteristických struktur a podařilo se nám jej izolovat na kultivační médium. Je možné, že ji italští kolegové nezaznamenali v důsledku odlišného metodologického přístupu – před izolací hub na kultivačním médiu neprováděli povrchovou sterilizaci kořenů a kultivaci prováděli jen po relativně krátkou dobu, za kterou nemusela velmi pomalu rostoucí houba Pleosporales sp. MV-2012 vůbec vytvořit viditelné kolonie rostoucí vně kořenů. Další otázkou zůstává, zda je druhý nejčastější námi získaný izolát, *Lulworthiales* sp. MV-

2012, blízce příbuzný s druhem *Lulworthia* sp., jenž byl izolován z vláknitých zbytků listů (Cuomo a kol. 1985). Přímé srovnání sekvencí není vzhledem k době, ve které došlo k výzkumu Cuomova týmu, není možné.

Další z endofytů, druh *Fuscoporia torulosa*, jsme pak získali pouze v jediném případě. Jedná se o druh stopkovýtrusé houby rozkládající dřevo a způsobující bílou hnilobu listnatých stromů v evropských lesích (Tomšovský a Jankovský 2007). Popsali jsme první případ výskytu této houby v mořském prostředí, ale vzhledem k výskytu jediného jejího izolátu napříč všemi našimi izolačními experimenty lze jen těžko odhadnout význam této houby v kořenech posidonie.

V rozporu s naší hypotézou (na rozdíl od SZ Středomoří – úzké spektrum, jen 1 DSE asociace, studie ze Středního Chorvatska, důsledně provedená na malém rozsahu území, jiný typ povrchové sterilizace, využití metod nezávislých na izolaci houbových kultur, odhalí více diverzifikovaná spektra endofytických hub) byla spektra hub získaná jak izolací čistých kultur, tak i nezávisle na izolaci, prakticky totožná a zároveň potvrzují výsledky studie ze SZ Středomoří (Vohník a kol. 2016). I ve středním Chorvatsku dominuje endofytickým houbám v kořenech p. Neptunovy jediný pomalu rostoucí mykobiont z řádu Pleosporales, a to taxon Pleosporales sp. MV-2012. Tato houba patří do relativně nedávno ustanovené čeledi Aigialaceae (Suetrong a kol. 2009) a, pokud víme, nebyla mimo kořeny posidonie dosud zaznamenána. Zdá se, že jejími nejbližší příbuznými druhy jsou abiotrofické druhy mořských hub, jež kolonizují kůru a dřevo pocházející z mangrovových porostů v tropických oblastech (např. *Aigialus grandis* nebo *Rimora mangrovei*) nebo houby z jihovýchodní Asie a Austrálie, které porůstají rozkládající se pletiva bambusu nebo palem (např. *Fissuroma aggregata*) (Suetrong a kol. 2009; Liu a kol. 2011). Až dosud však nebyl pozorována žádná jiná houba z čeledi Aigialaceae asociující s kořeny mořských trav. Studium endofytických hub p. Neptunovy jsme tak rozšířili známý rozsah habitatů hub z čeledi Aigialaceae.

Malá část získaného spektra endofytických hub (cca. 8% izolátů a 1,8% sekvencí) náležela ke dvěma zjevně blízce příbuzným taxonům v rámci řádu Lulworthiales. Tento řád zahrnuje jak mořské houby (Jones 2000; Kohlmeyer a kol. 2000), tak i druhy vyskytující se ve slaniskách a překyselených půdách v terestrickém prostředí (Hujšlová a kol. 2010). Obecně se houby z tohoto řádu považují za abiotrofické saprofyty kolonizující ligninovo – celulózoové substráty (Raghukumar 2017), ovšem některé druhy byly zaznamenány i v pletivech mořských trav. Například druh *Lindra thalassiae* asociuje s mořskými travami rodu *Thalassia*, *Lulworthia halima* pak s mořskou travou *Zostera marina* (Kohlmeyer a kol. 2000) a houba Lulworthiales sp. MV-2012 kolonizuje kořeny posidonie Neptunovy (Vohník a kol. 2016), jak se ukázalo i v této studii. Možná biotrofie asociací těchto hub s hostitelskými rostlinami a povaha jejich interakcí zůstává nejasná.

V rozporu s našimi hypotézami jsme prostřednictvím pyrosekvenací odhalili jen velmi málo

hub, které jsme jinak v kořenech p. Neptunovy nezaznamenali. Mezi ně patří dva mykobionty, které nebylo možné identifikovat a typicky terestrické saprofytní stopkovýtrusé houby, jejichž role v mořském prostředí je zcela neznámá.

Velmi úzké spektrum mykobiontů p. Neptunovy s naprostou převahou jediného druhu houby, které jsme získali v této studii, je u rostlin velmi ojedinělým jevem. Takováto druhová specifika se spíše vyskytuje u mykorhizních asociací nefotosyntetických mykoheterotrofních rostlin (např. Taylor a kol. 2002; Bidartondo a Bruns 2005) nebo některých druhů orchidejí, jejichž vyklíčení a vývoj závisí na přítomnosti vhodného mykorhizního partnera (např. Irwin a kol. 2007; Graham a Dearnaley 2012). Spektra endofytických hub jsou naopak zpravidla velmi různorodá a druhově bohatá, jak bylo již pozorováno v kořenech rostlin z nejrozličnějších typů rostlin, jakými jsou jehličnany mírného a boreálního pásma (Holdenrieder a Sieber 1992; Grünig a kol. 2002), trávy a rostliny z podrostu (Khidir a kol. 2010; Bruzone a kol. 2015), sladkovodní rostliny (Kohout a kol. 2012; You a kol. 2015) i mangrovy (Ananda a Sridhar 2002; Xing a Guo 2011). Studií zaměřených na endofytické houby v kořenech mořských trav bylo však dosud provedeno příliš málo na to, abychom mohli předkládat definitivní závěry ohledně jejich diverzity. Dominance houby z řádu Pleosporales v kořenech p. Neptunovy zato do jisté míry připomíná dominanci jiných, taxonomicky vzdálených druhů hub téhož řádu v kořenech pouštní trávy *Bouteloua gracilis*, kterou zaznamenali Porras-Alfaro a kol. (2008) a Khidir a kol. (2010).

O faktorech, které ovlivňují kolonizaci kořenů p. Neptunovy endofytickými houbami, jejich diverzitu a distribuci v kořenech, není známo prakticky nic. Torta a kol. (2015) pozorovali vyšší houbovou kolonizaci jejích kořenů z kamenitého substrátu v porovnání z kořenů z matky a písku. Je známo, že některé endofytické houby usnadňují rostlinám z kamenitého substrátu získávání minerálních živin. K tomu využívají své enzymatické vybavy, kterou jsou schopné v podstatě rozpouštět skály (od toho je odvozen jejich anglický název “rock-eating fungi”) (Landeweert a kol. 2001; Rosenstock 2009). Možná podobná role endofytů p. Neptunovy dosud nebyla testována – k tomu by bylo třeba úspěšně vypěstovat axenické kultury těchto hub, které by byly kultivovatelné po delší dobu a rostly i po několikerém přeočkování, což se nám dosud nepodařilo.

Prostřednictvím mikroskopických studií kořenů p. Neptunovy z dalších lokalit i díky izolacím hub na kultivační média jsme postupně ukázali, že se zkoumaná symbióza vyskytuje při celém evropském i maloasijském pobřeží Středozemního moře.

Endemická mořská tráva Středozemního moře posidonie Neptunova je ve značné části svého areálu rozšíření kolonizována tmavě zbarvenou septovanou houbou, která tvoří charakteristické struktury – povrchové hyfy a hyfový plášť, vnitrokořenové hyfy a vnitrobuněčná mikrosklerocia. Tato asociace se velmi podobá terestrickým endofytickým asociacím tvořeným houbami známým jako dark septate endophytes (DSE). Symbióza p. Neptunovy se studovanou houbou je jedinečná. Hostitelská rostlina je kolonizována téměř bezvýhradně jediným druhem houby, a tento druh houby kolonizuje pouze tuto jedinou rostlinu. Taxonomicky se tato houba řadí do čeledi Aigialaceae v rámci řádu Pleosporales. Na většině lokalit dominuje i co do počtu získaných izolátů na kultivačním médiu, ale v některých oblastech, zejména v Turecku a na Sicílii, ji co do četnosti výskytu, soudě podle počtu získaných izolátů, sekunduje jiná vřeckovýtrusá houba z řádu Lulworthiales.

Semenáčky p. Neptunovy těmito endofytickými houbami kolonizovány nejsou. Zato na rozdíl od dospělých rostlin tvoří bohaté kořenové vlášení. V průběhu ontogeneze dochází k úbytku kořenového vlášení a naopak k nárůstu houbové kolonizace. Tato situace odpovídá stavu u dalších rostlin, kdy se husté kořenové vlášení a rozsáhlá houbová kolonizace jen zřídka vyskytují zároveň.

In a vast proportion of its area, *Posidonia oceanica*, an endemic seagrass species of the Mediterranean, is being colonized by a dark coloured septate fungus which forms characteristic structures. These are superficial hyphae and hyphal mantle, intraradical hyphae and intracellular microsclerotia. This associations strongly resembles dark septate endophytes (DSE), a common group of endophytic fungi of terrestrial plants. Symbiosis between *P. oceanica* and the studied fungus is quite unique as the host plant is being colonized almost exclusively by a single fungus and the fungus colonizes only the single plant. Taxonomically, the fungus belongs to the family Aigialaceae within order Pleosporales. The fungus is usually dominating spectra of isolated fungi as well. However, in some regions of Turkey and Sicily, as for the number of isolated fungi, the Pleosporalean fungus is second to another ascomycete from the order Lulworthiales.

Seedlings of *P. oceanica* are not being colonized by the endophytic fungi. Unlike adult plants, they form dense root hair cover. During the plantlet growth, abundance of root hairs decreases as fungal colonization increases. This corresponds with the state of other plants that usually suppress formation of root hairs while colonized by endophytic fungi and *vice versa*.

8 Seznam literatury

- Ananda K, Sridhar KR (2002) Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west coast of India. *Can J Microbiol* 48(10):871-878
- Andersen FØ, Andersen T (2006) Effects of arbuscular mycorrhizae on biomass and nutrients in the aquatic plant *Littorella uniflora*. *Freshwater Biol* 51(9):1623-1633
- Arnaud-Haond S, Duarte CM, Diaz-Almela E, Marbá N, Sintès T, Serrão EA (2012) Implications of extreme life span in clonal organisms: millenary clones in meadows of the threatened seagrass *Posidonia oceanica*. *PLoS ONE* 7, e30454. doi:10.1371/journal.pone.0030454
- Badalamenti F, Alagna A, Fici S (2015) Evidences of adaptive traits to rocky substrates undermine paradigm of habitat preference of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Sci Rep* 5:8804
- Balestri E, Piazzì L, Cinelli F (1998a) In vitro germination and seedling development of *Posidonia oceanica*. *Aquat Bot* 60(1):83-93
- Beck-Nielsen D, Madsen TV (2001) Occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in aquatic macrophytes from lakes and streams. *Aquat Bot* 71:141–148
- Belzunce M, Navarro RM, Rapoport HF (2008a) *Posidonia oceanica* seeds from drift origin: viability, germination and early plantlet development. *Bot Mar* 51:1–9
- Belzunce M, Navarro RM, Rapoport HF (2008b) *Posidonia oceanica* seedling root structure and development. *Aquat Bot* 88:203–210
- Bernal AA, de Camargo Smidt E, Bona C (2015) Spiral root hairs in Spiranthinae (Cranichideae: Orchidaceae). *Braz J Bot* 38(2):411-415
- Bidartondo MI, Bruns TD (2005) On the origins of extreme mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): performance trade-offs during seed germination and seedling development. *Mol Ecol* 14:1549-1560
- Blackwell M (2011) The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot* 98:426-438
- Borg JA, Rowden AA, Attrill MJ, Schembri PJ, Jones MB (2006) Wanted dead or alive: high diversity of macroinvertebrates associated with living and ‘dead’ *Posidonia oceanica* matte. *Mar Biol* 149(3):667-677
- Bristow JM, Whitcombe M (1971) The role of roots in the nutrition of aquatic vascular plants. *Am J Bot* 58(1):8-13
- Brix H, Lyngby JE (1985) Uptake and translocation of phosphorus in eelgrass (*Zostera marina*). *Mar Biol* 90(1):111-116
- Brundrett MC (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol* 154:275–

- Brundrett MC (2004) Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biol Rev* 79:473–495
- Brundrett MC (2009) Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. *Plant Soil* 320:37–77
- Bruzzone MC, Fontenla SB, Vohník M (2015) Is the prominent ericoid mycorrhizal fungus *Rhizoscyphus ericae* absent in the Southern Hemisphere's Ericaceae? A case study on the diversity of root mycobionts in *Gaultheria* spp. from northwest Patagonia, Argentina. *Mycorrhiza* 25:25–40
- Cuomo V, Vanzanella F, Fresi E, Cinelli F, Mazzella L (1985) Fungal flora of *Posidonia oceanica* and its ecological significance. *Trans Br Mycol Soc* 84:35–40
- Danielson RM, Visser S (1990) The mycorrhizal and nodulation status of container-grown trees and shrubs reared in commercial nurseries. *Can J For Res* 20:609–614
- de Kroon H, Visser EJ (Eds.) (2013) Root ecology (Vol. 168). Springer Science & Business Media
- Estrada M (1996) Primary production in the northwestern Mediterranean. *Sci Mar* 60:55–64
- Farmer AM (1985) The occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in isoetid-type submerged aquatic macrophytes under naturally varying conditions. *Aquat Bot* 21(3):245–249
- Fernando AA, Currah RS (1996) A comparative study of the effects of the root endophytes *Leptodontidium orchidicola* and *Phialocephala fortinii* (Fungi Imperfecti) on the growth of some subalpine plants in culture. *Can J Bot* 74:1071–1078
- Fourqurean JW, Duarte CM, Kennedy H, Marbà N, Holmer M, Mateo MA, Apostolaki ET, Kendrick GA, Krause-Jensen D, McGlathery KJ, Serrano O (2012) Seagrass ecosystems as a globally significant carbon stock. *Nat Geosci* 5:505–509
- García-Martínez M, Kuo J, Kilminster K, Walker D, Rosselló-Mora R, Duarte CM (2005) Microbial colonization in the seagrass *Posidonia* spp. roots. *Mar Biol Res* 1:388–395
- Gilroy S, Jones DL (2000) Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends Plant Sci* 5:56–60
- Graham RR, Dearnaley JDW (2012) The rare Australian epiphytic orchid *Sarcochilus weinthalii* associates with a single species of *Ceratobasidium*. *Fungal Divers* 54:31–37
- Green EP, Short FT (2003) World atlas of seagrasses. University of California Press, Berkeley
- Grünig CR, Sieber TN, Rogers SO, Holdenrieder O (2002) Spatial distribution of dark septate endophytes in a confined forest plot. *Mycol Res* 106:832–840
- Hawksworth DL (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 105:1422–1432

- Hawksworth DL, Rossman AY (1997) Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology*, 87(9):888-891
- Haznedaroğlu MZ, Akarsu F (2009) Anatomical features of *Posidonia oceanica* (L.) Delile growing in Turkey. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* 29(1):37-43
- Hemminga MA, Duarte CM (2000) *Seagrass ecology*. Cambridge University Press, Cambridge
- Holdenrieder O, Sieber TN (1992) Fungal associations of serially washed healthy non-mycorrhizal roots of *Picea abies*. *Mycol Res* 96:151-156
- Hujšlová M, Kubátová A, Chudíčková M, Kolařík M (2010) Diversity of fungal communities in saline and acidic soils in the Soos National Natural Reserve, Czech Republic. *Mycol Prog* 9(1):1-15
- Hussain SS, Ali M, Ahmad M, Siddique KH (2011) Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnol Adv* 29(3):300-311
- Infantes E, Orfila A, Bouma TJ, Simarro G, Terrados J (2011) *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* seedling tolerance to wave exposure. *Limnol Oceanogr* 56(6):2223-2232
- Irwin MJ, Bougoure JJ, Dearnaley JDW (2007) *Pterostylis nutans* (Orchidaceae) has a specific association with two *Ceratobasidium* root-associated fungi across its range in eastern Australia. *Mycoscience* 48:231-239
- Jones EG (2000) Marine fungi: some factors influencing biodiversity. *Fungal Divers* 4(193):53-73
- Jones EBG (2011) Are there more marine fungi to be described? *Bot Mar* 54:343-354
- Jumpponen A, Trappe JM (1998) Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytol* 140(2):295-310
- Khan AG, Belik M (1995) Occurrence and ecological significance of mycorrhizal symbiosis in aquatic plants. In: Varma A, Hock B (eds) *Mycorrhiza*. Springer, Berlin
- Khidir HH, Eudy DM, Porras-Alfaro A, Herrera J, Natvig DO, Sinsabaugh RL (2010) A general suite of fungal endophytes dominate the roots of two dominant grasses in a semiarid grassland. *J Arid Environ* 74:35-42
- Kirk P, Cannon P, Minter D, Stalpers J (2008) *Ainsworth and Bisby's dictionary of the Fungi*, 10th edn. CABI, Wallingford
- Kohlmeyer J, Spatafora JW, Volkmann-Kohlmeyer B (2000) Lulworthiales, a new order of marine Ascomycota. *Mycologia* 453-458
- Kohout P, Sýkorová Z, Čtvrtlíková M, Rydlová J, Suda J et al (2012) Surprising spectra of root-associated fungi in submerged aquatic plants. *FEMS Microbiol Ecol* 80:216–235
- Kuo J, McComb AJ (1998) *Cymodoceaceae*. In: Kubitzki K (ed) *The families and genera of vascular plants: Flowering Plants - Monocotyledons*. Springer, Berlin, Heidelberg

- Kuo J, McComb AJ, Cambridge ML (1981) Ultrastructure of the seagrass rhizosphere. *New Phytol* 89:139–143
- Landeweert R, Hoffland E, Finlay RD, Kuyper TW, van Breemen N (2001) Linking plants to rocks: ectomycorrhizal fungi mobilize nutrients from minerals. *Trends Ecol Evol* 16(5):248-254
- Leitgeb H (1865) Luftwurzeln der orchideen. *Flora* 18(50):93
- Lepoint G, Millet S, Dauby P, Gobert S, Bouquegneau JM (2002) Annual nitrogen budget of the seagrass *Posidonia oceanica* as determined by in situ uptake experiments. *Mar Ecol Prog Ser* 237:87-96
- Lepoint G, Dauby P, Gobert S (2004) Applications of C and N stable isotopes to ecological and environmental studies in seagrass ecosystems. *Mar Pollut Bull* 49(11-12):887-891
- Linderman RG (1988) Mycorrhizal interactions with the rhizosphere microflora: the mycorrhizosphere effect. *Phytopathology* 78(3):366-371
- Liu JK, Phookamsak R, Jones EG, Zhang Y, Ko-Ko TW, Hu HL, Boonmee S, Doilom M, Chukeatirote E., Bahkali AH, Wang Y (2011) *Astrosphaeriella* is polyphyletic, with species in *Fissuroma* gen. nov., and *Neoastrsphaeriella* gen. nov. *Fungal Divers* 51(1):135-154
- Lukešová T, Kohout P, Větrovský T, Vohník M (2015) The potential of Dark Septate Endophytes to form root symbioses with ectomycorrhizal and ericoid mycorrhizal middle European forest plants. *PLoS ONE* 10, e0124752. doi:10.1371/journal.pone.0124752 Mycorrhiza
- Madsen TV, Cedergreen N (2002) Sources of nutrients to rooted submerged macrophytes growing in a nutrient-rich stream. *Freshwater Biol* 47:283–291
- Marx DH (1969) Influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on resistance of pine roots to pathogenic infections I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology* 59:153–163
- Mayerhofer MS, Kernaghan G, Harper KA (2013) The effects of fungal root endophytes on plant growth: a meta-analysis. *Mycorrhiza* 23(2):119-128
- McGonigle TP, Miller MH, Evans DG, Fairchild GL, Swan JA (1990) A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol* 115(3):495-501
- McRoy CP, Barsdate RJ (1970) Phosphate absorption in eelgrass. *Limnol Oceanogr* 15(1):6-13
- Melzer B, Steinbrecher T, Seidel R, Kraft O, Schwaiger R, Speck T (2010) The attachment strategy of English ivy: a complex mechanism acting on several hierarchical levels. *J R Soc Interface* 7(50):1383-1389
- Melzer B, Seidel R, Steinbrecher T, Speck T (2011) Structure, attachment properties, and ecological importance of the attachment system of English ivy (*Hedera helix*). *J Exp Bot* 63(1):191-

- Münzenberger B, Bubner B, Wöllecke J, Sieber TN, Bauer R et al (2009) The ectomycorrhizal morphotype *Pinirhiza sclerotia* is formed by *Acephala macrosclerotiorum* sp nov., a close relative of *Phialocephala fortinii*. Mycorrhiza 19:481–492
- Newsham KK (2011) A meta-analysis of plant responses to dark septate root endophytes. New Phytol 190(3):783–793
- Nielsen SL, Thingstrup I, Wigand C (1999) Apparent lack of vesicular-arbuscular mycorrhiza (VAM) in the seagrasses *Zostera marina* L. and *Thalassia testudinum* Banks ex König. Aquat Bot 63:261–266
- O'Dell TE, Massicotte HB, Trappe JM (1993) Root colonization of *Lupinus latifolius* Agardh. and *Pinus contorta* Dougl. by *Phialocephala fortinii* Wang & Wilcox. New Phytol 124:93–100
- Ottow JC, Glathe H (1968) Rose bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. Appl Microbiol 16(1):170
- Panno L, Bruno M, Voyron S, Anastasi A, Gnani G, Miserere L, Varese GC (2013) Diversity, ecological role and potential biotechnological applications of marine fungi associated to the seagrass *Posidonia oceanica*. N Biotechnol 30:685–694
- Park D (1974) Accumulation of fungi by cellulose exposed in a river. Trans Br Mycol Soc 63(3):437–447
- Pasqualini V, Pergent-Martini C, Clabaut P, Pergent G (1998) Mapping of *Posidonia oceanica* using aerial photographs and side scan sonar: application off the island of Corsica (France). Estuar Coast Shelf Sci 47(3):359–367
- Pedersen MF, Borum J (1992) Nitrogen dynamics of eelgrass *Zostera marina* during low nutrient availability. Mar Ecol Prog Ser 80:65–73
- Peterson RL, Farquhar ML (1996) Root hairs: specialized tubular cells extending root surfaces. Bot Rev 62(1):1–40
- Peterson RL, Wagg C, Pautler M (2008) Associations between microfungi endophytes and roots: do structural features indicate function? Botany 86:445–456
- Pohlert T (2014) The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR). R package, <http://CRAN.R-project.org/package=PMCMR>
- Porrás-Alfaro A, Herrera J, Sinsabaugh RL, Odenbach KJ, Lowrey T, Natvig DO (2008) Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. Appl Environ Microbiol 74(9):2805–2813
- Raghukumar S (2017) Origin and evolution of marine fungi. In Fungi in coastal and oceanic marine

- ecosystems (pp. 307-321). Springer, Cham
- Raven JA (1981) Nutritional strategies of submerged benthic plants: the acquisition of C, N and P by rhizophytes and haptophytes. *New Phytol* 88(1):1-30
- Redecker D, Kodner R, Graham LE (2000) Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* 289:1920–1921
- Remy W, Taylor TN, Hass H, Kerp H (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci* 91(25):11841-11843
- Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman ARA (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol* 182(2):314-330
- Rosenstock NP (2009) Can ectomycorrhizal weathering activity respond to host nutrient demands? *Fungal Biol Rev* 23:107-114
- Ruiz-Lozano JM, Azcón R, Gomez M (1995) Effects of arbuscular-mycorrhizal glomus species on drought tolerance: physiological and nutritional plant responses. *Appl Environ Microbiol* 61(2):456-460
- Sakayaroj J, Preedanon S, Supaphon O, Jones EG, Phongpaichit S (2010) Phylogenetic diversity of endophyte assemblages associated with the tropical seagrass *Enhalus acoroides* in Thailand. *Fungal Diversity* 42(1):27-45
- Schneider J, Stürmer SL, Guilherme LRG, de Souza Moreira FM, de Sousa Soares CRF (2013) Arbuscular mycorrhizal fungi in arsenic-contaminated areas in Brazil. *J Hazard mater* 262:1105-1115
- Schutten J, Dainty J, Davy AJ (2005) Root anchorage and its significance for submerged plants in shallow lakes. *J Ecol* 93(3):556-571
- Selosse MA, Le Tacon F (1998) The land flora: a phototroph-fungus partnership? *Trends Ecol Evol* 13:15–20
- Shannon EL (1953) The production of root hairs by aquatic plants. *Am Midl Nat* 474-479
- Shoemaker G, Wyllie-Echeverria S (2013) Occurrence of rhizomal endophytes in three temperate northeast pacific seagrasses. *Aquat Bot* 111:71-73
- Sieber TN (2002) Fungal root endophytes. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi I (eds) *Plant roots—the hidden half*, 3rd edn. Marcel Dekker, New York
- Smith SE, Read DJ (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. Academic, London
- Somaschini A, Gravina MF, Ardizzone GD (1994) Polychaete depth distribution in a *Posidonia oceanica* bed (rhizome and matte strata) and neighbouring soft and hard bottoms. *Mar Ecol* 15(2):133-151
- Søndergaard M, Laegaard S (1977) Vesicular-arbuscular mycorrhiza in some aquatic vascular

plants. *Nature* 268:232–233

- Soong K, Chiu ST, Chen CNN (2013) Novel seed adaptations of a monocotyledon seagrass in the wavy sea. *PloS one* 8(9):e74143
- Stapel J, Aarts TL, van Duynhoven BH, de Groot JD, van den Hoogen PH, Hemminga MA (1996) Nutrient uptake by leaves and roots of the seagrass *Thalassia hemprichii* in the Spermonde Archipelago, Indonesia. *Mar Ecol Prog Ser* 134:195-206
- Sudová R, Rydlová J, Čtvrtlíková M, Havránek P, Adamec L (2011) The incidence of arbuscular mycorrhiza in two submerged *Isoetes* species. *Aquat Bot* 94:183–187
- Suetrong S, Schoch CL, Spatafora JW, Kohlmeyer J, Volkmann-Kohlmeyer B, Sakayaroj J, Phongpaichit S, Tanaka K, Hirayama K, Jones EBG (2009) Molecular systematics of the marine Dothideomycetes. *Stud Mycol* 64:155-173
- Supaphon P, Phongpaichit S, Rukachaisirikul V, Sakayaroj J (2014) Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from the seagrass *Enhalus acoroides*. *Indian J Geomarine Sci* 43(5):785–797
- Szmeja J, Galka A (2008) Phenotypic responses to water flow and wave exposure in aquatic plants. *Acta Soc Bot Pol* 77(1)
- Šraj-Kržič N, Pongrac P, Klemenc M, Kladnik A, Regvar M, Gabersčik A (2006) Mycorrhizal colonisation in plants from intermittent aquatic habitats. *Aquat Bot* 85(4):331-336
- Taylor DL, Bruns TD, Leake JR, Read DJ (2002) Mycorrhizal specificity and function in mycoheterotrophic plants. In: Sanders IR, van der Heijden MG (eds) *Ecological studies. Mycorrhizal Ecology*. Springer, Berlin, p 375–413
- Tejesvi MV, Sauvola T, Pirttilä AM, Ruotsalainen AL (2013) Neighboring *Deschampsia flexuosa* and *Trientalis europaea* harbor contrasting root fungal endophytic communities. *Mycorrhiza* 23:1–10
- Terrados J, Williams SL (1997) Leaf versus root nitrogen uptake by the surfgrass *Phyllospadix torreyi*. *Mar Ecol Prog Ser* 149:267-277
- Tomšovský M, Jankovský L (2007) DNA sequence analysis of extraordinary fruiting specimens of *Fuscoporia torulosa* (*Phellinus torulosus*) on *Pyrus* spp. *Czech Mycol* 59(1):91-99
- Torta L, Lo Piccolo S, Piazza G, Burruano S, Colombo P, Ottonello D, Perrone R, Di Maida G, Pirrotta M, Tomasello A, Calvo S (2015) *Lulwoana* sp., a dark septate endophyte in roots of *Posidonia oceanica* (L.) Delile seagrass. *Plant Biol (Stuttg)* 17:505–511
- Van Loon L, Bakker PAHM (2003) Signalling in rhizobacteria-plant interactions. In *Root ecology* (pp. 297-330). Springer, Berlin, Heidelberg
- Vandenkoornhuyse P, Baldauf SL, Leyval C, Straczek J, Young JPW (2002) Extensive fungal

diversity in plant roots. *Science* 295:2051

- Vohník M, Albrechtová J (2011) The co-occurrence and morphological continuum between ericoid mycorrhiza and dark septate endophytes in roots of six European *Rhododendron* species. *Folia Geobot* 46: 373–386
- Waisel Y, Eshel A (2002) Functional diversity of various constituents of a single root system. *Plant roots: the hidden half* 3:157-174
- Wang B, Qiu YL (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16(5):299-363
- Weston LA (2003) Root exudates: an overview. In *Root ecology* (pp. 235-255). Springer, Berlin, Heidelberg
- Wilson D (1995) Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 274-276
- Wilson JG, Bennett IJ (2008) Nutrient requirements of in vitro cultured *Halophila ovalis* and *Posidonia coriacea*: nitrogen source. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 92(2):155-163
- Wurzburger N, Bledsoe CS (2001) Comparison of ericoid and ectomycorrhizal colonization and ectomycorrhizal morphotypes in mixed conifer and pygmy forests on the northern California coast. *Can J Bot* 79:1202–1210
- Xing X, Guo S (2011) Fungal endophyte communities in four Rhizophoraceae mangrove species on the south coast of China. *Ecol Res* 26(2):403-409
- Yan X, Liao H, Beebe SE, Blair MW, Lynch JP (2004) QTL mapping of root hair and acid exudation traits and their relationship to phosphorus uptake in common bean. *Plant Soil* 265(1-2):17-29
- You X, Luo Z, Su Y, Gu L, Gu H (2015) *Peridiniopsis jiulongensis*, a new freshwater dinoflagellate with a diatom endosymbiont from China. *Nova Hedwigia* 101(3-4):313-326
- Yu T, Nassuth A, Peterson RL (2001) Characterization of the interaction between the dark septate fungus *Phialocephala fortinii* and *Asparagus officinalis* roots. *Can J Microbiol* 47:741–753

9 Seznam publikací uchazeče a podíl studenta na jednotlivých publikacích

Vohník M, Borovec O, Župan I, Vondrášek D, Petrtyl M, Sudová R 2015. Anatomically and morphologically unique dark septate endophytic association in the roots of the Mediterranean endemic seagrass *Posidonia oceanica*. *Mycorrhiza*, 25(8), 663-672

student se podílel na zpracovávání vzorků, přípravě preparátů, mikroskopickém pozorování a získávání fotografií

Vohník M, Borovec O, Kolařík M 2016. Communities of cultivable root mycobionts of the seagrass *Posidonia oceanica* in the northwest Mediterranean Sea are dominated by a hitherto undescribed pleosporalean dark septate endophyte. *Microbial ecology*, 71(2), 442-451

student se podílel na kultivaci vzorků

Vohník M, Borovec O, Kolařík M, Sudová R 2017. Fungal root symbionts of the seagrass *Posidonia oceanica* in the central Adriatic Sea revealed by microscopy, culturing and 454-pyrosequencing. *Marine Ecology Progress Series*, 583, 107-120

student se podílel na izolaci na kultivační médium, na kultivaci vzorků, vyhodnocení experimentu, na amplifikaci DNA

Borovec O, Vohník M 2018. Ontogenetic transition from specialized root hairs to specific root-fungus symbiosis in the dominant Mediterranean seagrass *Posidonia oceanica*. *Scientific reports*, 8(1), 10773

student se podílel na sběru vzorků, přípravě preparátů, mikroskopickém pozorování, zpracování získaných dat a sepsání manuskriptu

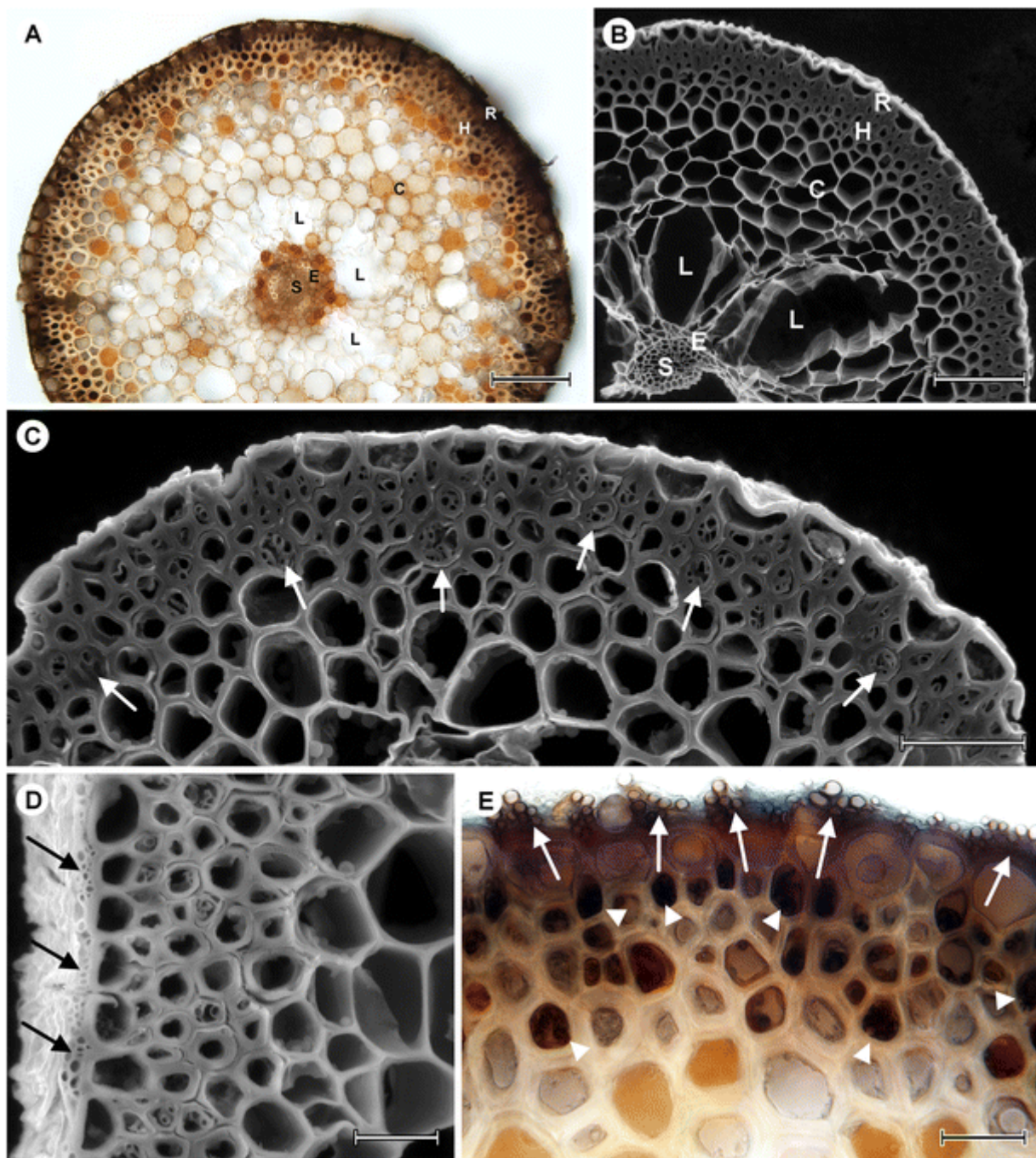
Tabulka 1: Přehled lokalit, kde jsme odebrali vzorky kořenů posidonie Neptunovy

Označení	Název lokality	Země	Souřadnice
HR-1	Borak	Chorvatsko	N42.92236, E17.34685
HR-2	Kukuljari	Chorvatsko	N43.75960, E15.63410
IT-3	Cogoleto	Itálie	N44.38016, E8.63467
IT-4	Finale Ligure	Itálie	N44.17337, E8.36765
FR-5	Antibes	Francie	N43.55726, E7.12209
FR-6	Cap Roux, Saint-Raphaël	Francie	N43.45026, E6.91951
FR-7	Sanary-sur-Mer	Francie	N43.12054, E5.77545
FR-8	Plage de Paulilles, Paulilles	Francie	N42.50236, E3.12456
ES-9	L'Escala	Španělsko	N42.10744, E3.16892
ES-10	Tamariu	Španělsko	N41.91756, E3.20761
ES-11	Llafranc	Španělsko	N41.89343, E3.19391
HR-12	Obun	Chorvatsko	N43.85000, E15.45534
HR-13	Gangaro II	Chorvatsko	N43.86230, E15.43800
HR-14	Gangaro I	Chorvatsko	N43.86387, E15.43405
HR-15	Veli Ošljak	Chorvatsko	N43.87555, E15.43755
HR-16	Košara Lighthouse	Chorvatsko	N43.88220, E15.40220
HR-17	Košara	Chorvatsko	N43.88379, E15.39937
HR-18	Veli Babuljaš	Chorvatsko	N43.87412, E15.35275
FR-19	Cabasson	Francie	N43.09926, E6.32504
FR-20	Les Arnettes	Francie	N43.32922, E5.03849
ES-21	Estepona	Španělsko	N36.42749, W5.12923
ES-22	Cabo de Gata	Španělsko	N36.72595, W2.19537
ES-23	Villaricos	Španělsko	N37.26676, W1.75151
ES-24	Cabo de Palos	Španělsko	N37.63355, W0.68996
ES-25	Calp, Cala el Racó	Španělsko	N38.63556, E0.07124
ES-26	Platja dels Muntanyans, Torredembarra	Španělsko	N41.14475, E1.41552
ES-27	Cope, Calabardina	Španělsko	N37.43672, W1.48422
ES-28	Platja de Capicorb, Cap i Corb	Španělsko	N40.20711, E0.25956
GR-29	Kalami	Řecko	N39.74227, E19.93443
GR-30	Kassiopi Bay, Kerkira	Řecko	N39.78941, E19.91542
AL-31	Orikum I (shipwreck), Vlorë	Albánie	N40.34226, E19.40898
AL-32	Orikum II, Vlorë	Albánie	N40.35723, E19.40926
ME-33	Crni Rt, Sutomore	Černá Hora	N42.13595, E19.01549
ME-34	Sveta Nedelja, Petrovac	Černá Hora	N42.19762, E18.93726
ME-35	Sveti Stefan I	Černá Hora	N42.25022, E18.89463
ME-36	Krimovica	Černá Hora	N42.27985, E18.78738
HR-37	Nevidane, Pašman	Chorvatsko	N43.98368, E15.33831
HR-38	Dobropoljana, Pašman	Chorvatsko	N43.98713, E15.33295
HR-39	Žman, Dugi Otok	Chorvatsko	N44.00308, E15.05930
HR-40	Rudula, Šolta	Chorvatsko	N43.39362, E16.18257
HR-41	Zlatni Rat, Bol, Brač	Chorvatsko	N43.25838, E16.63897
IT-42	Bari	Itálie	N41.11440, E16.91165
IT-43	Torre Santa Sabina	Itálie	N40.76603, E17.68615
IT-44	Otranto	Itálie	N40.16390, E18.48426
IT-45	Borraco (dříve Mirante)	Itálie	N40.30151, E17.62022

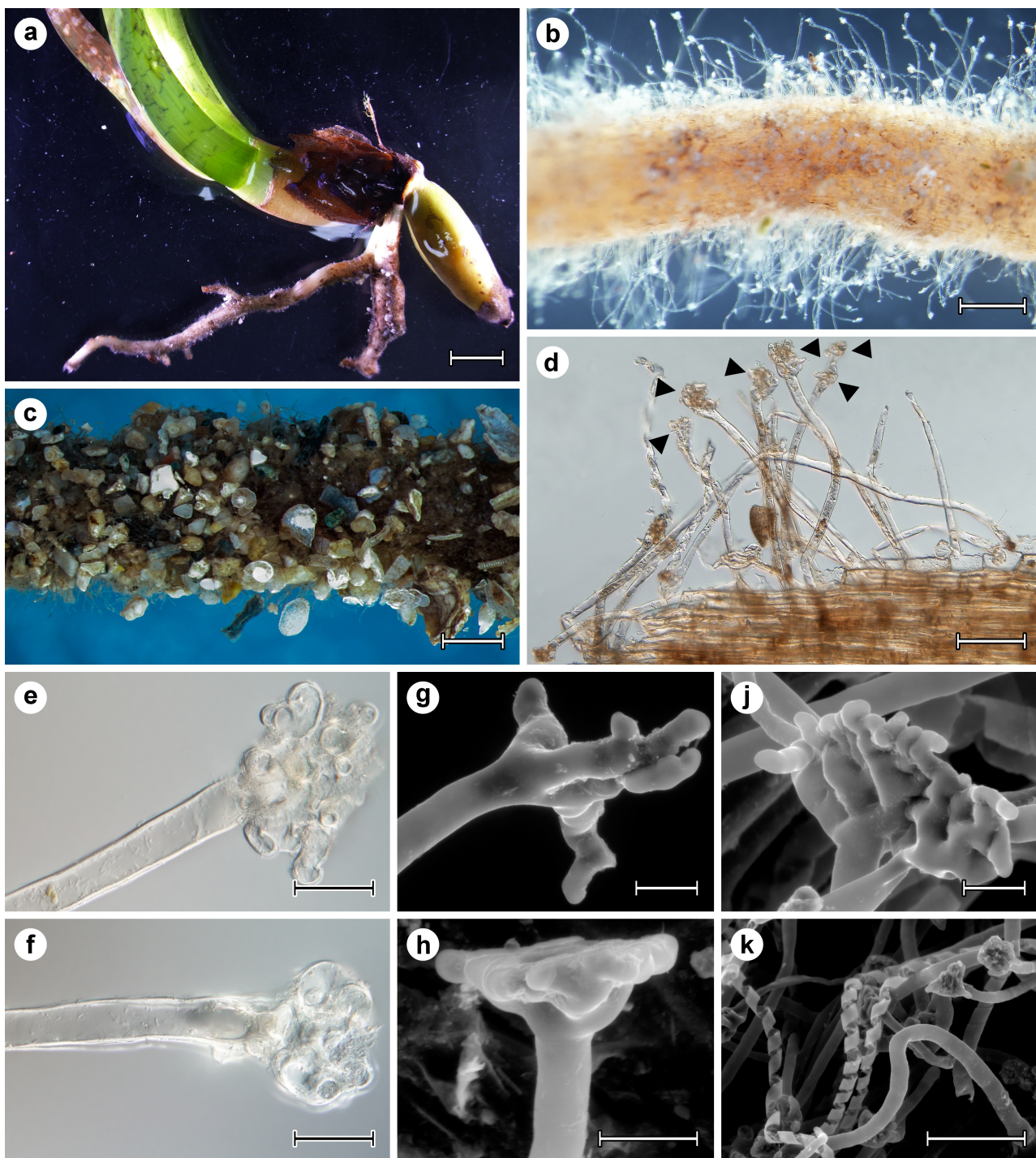
Označení	Název lokality	Země	Souřadnice
IT-46	Scifo (Capo Colonna)	Itálie	N39.02764, E17.20225
IT-47	Cucco-riviere	Itálie	N39.69956, E15.81001
IT-48	San Felice Circeo	Itálie	N41.22961, E13.09617
IT-49	Civitavecchia	Itálie	N42.08692, E11.79611
IT-50	Quercianella	Itálie	N43.45631, E10.36824
FR-51	Marina di Pevani	Francie – Korsika	N42.02594, E8.70131
FR-52	Caspiu	Francie – Korsika	N42.30203, E8.66183
FR-53	Tizzano	Francie – Korsika	N41.53631, E8.85544
FR-54	Pavellone	Francie – Korsika	N41.60181, E9.33006
FR-55	Santa-Lucia-di-Moriani	Francie – Korsika	N42.39667, E9.53528
FR-56	Marine de Sisco	Francie – Korsika	N42.80917, E9.48944
CY-57	Lapta	Severní Kypr	N35.35167, E33.16733
CY-58	Cape Cormakitis, Sadrazamköy	Severní Kypr	N35.40333, E32.92078
CY-59	Alagadi	Severní Kypr	N35.33506, E33.48817
CY-60	Karpaz, Anayolu	Severní Kypr	N35.60825, E34.45069
CY-61	Agioi Anargioi	Kypr	N34.97597, E34.07639
CY-62	Konnos point	Kypr	N34.98517, E34.07853
CY-63	Divine coast, Agios Theodoros	Kypr	N34.75708, E33.41961
ME-64	Trsteno	Černá Hora	N42.27336, E18.80058
ME-65	Sveti Stefan II	Černá Hora	N42.25311, E18.89444
ME-66	Sveti Stefan red sand III	Černá Hora	N42.25244, E18.89578
TR-67	Side	Turecko	N36.76199, E31.37840
TR-68	Kaş	Turecko	N36.19561, E29.64214
TR-69	Fethiye	Turecko	N36.68876, E29.04367
TR-70	Marmaris I	Turecko	N36.78526, E28.26232
TR-71	Marmaris II	Turecko	N36.79082, E28.30403
IT-72	Briatico	Itálie	N38.72677, E16.04193
IT-73	Milazzo	Itálie – Sicílie	N38.23420, E15.24934
IT-74	Portopalo di Capo Passero	Itálie – Sicílie	N36.66924, E15.12654
IT-75	Torre di Gaffe	Itálie – Sicílie	N37.13936, E13.83184
IT-76	Sciacca	Itálie – Sicílie	N37.50340, E13.09297
IT-77	Biscione	Itálie – Sicílie	N37.70200, E12.47322
IT-78	San Vito Lo Capo I	Itálie – Sicílie	N38.18355, E12.73269
IT-79	San Vito Lo Capo II	Itálie – Sicílie	N38.14973, E12.73085
IT-80	Trabia	Itálie – Sicílie	N37.99711, E13.65812
TR-81	Kabatepe, Eceabat	Turecko	N40.21136, E26.27528
TR-82	Çanakkale	Turecko	N40.07474, E26.35809
TR-83	Narli, Erdek	Turecko	N40.48549, E27.68493
TR-84	Geyikli/Bozcaada jetty	Turecko	N39.81928, E26.16394
TR-85	Cunda Island, Ayvalik	Turecko	N39.33558, E26.61606
TR-86	Siğacik	Turecko	N38.16512, E26.78356
TR-87	Güzelçamli	Turecko	N37.76102, E27.25861
TR-88	Siçan Island (Rat Island), Antalya	Turecko	N36.80261, E30.58830
TR-89	Aydincik	Turecko	N36.14792, E33.32761

Tabulka 2: Vzorky kořenů použité pro jednotlivé články nebo studie

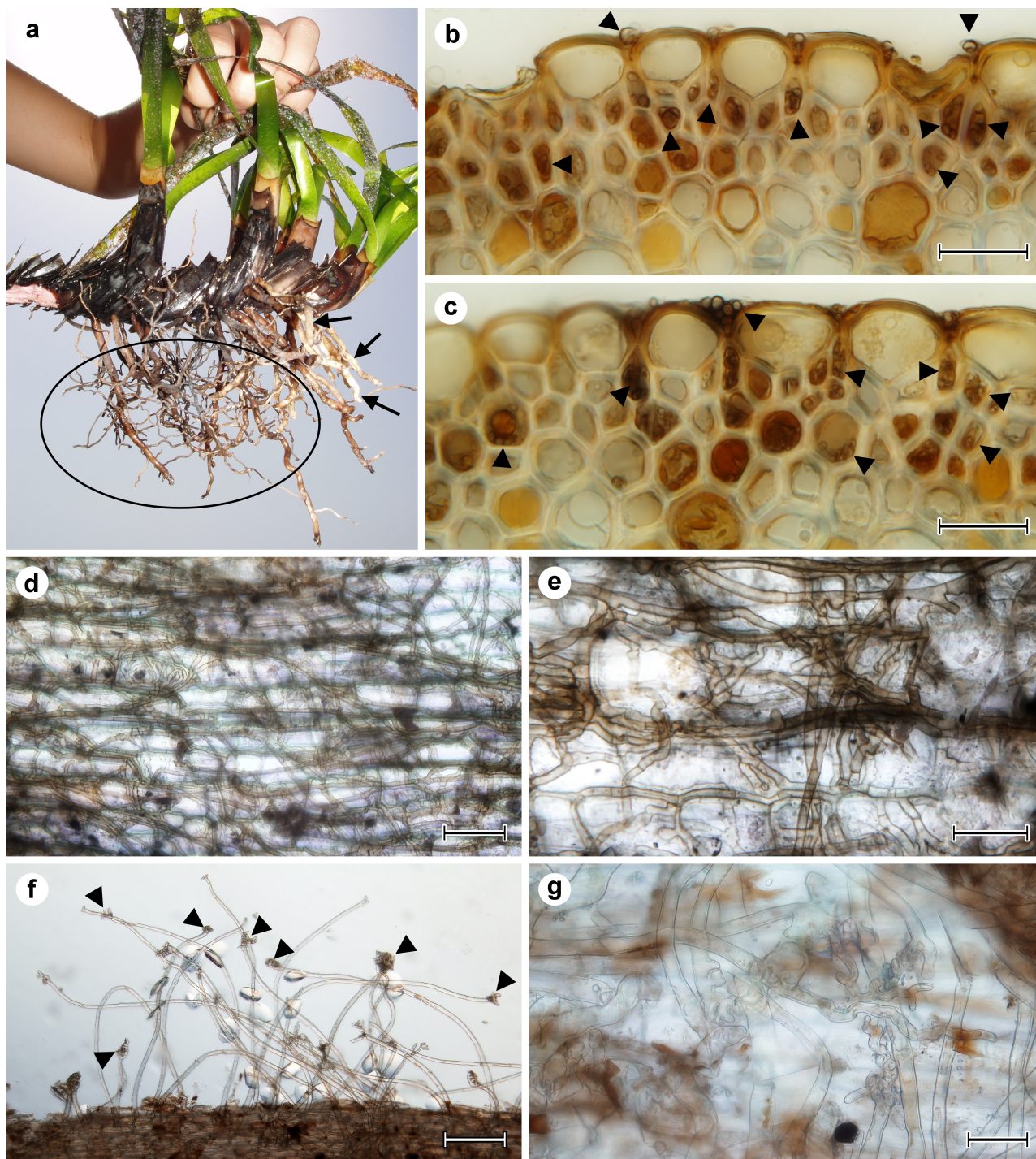
Článek / studie	Vzorky z lokalit	
Vohník a kol. 2015	HR-1, 2 IT-3, 4 FR-5, 6, 7, 8 ES-9, 10, 11	morfologie
Vohník a kol. 2016	HR-1, 2 IT-3, 4 FR-5, 6, 7, 8 ES-9, 10, 11	izolace
Vohník a kol. 2017	HR-12, 13, 14, 15, 16, 17, 18	izolace
Borovec a Vohník 2018	ME-33, 36, 64, 65, 66	vztah houbové kolonizace a vlášení
Izolace Turecko I.	TR-67, 68, 69, 70, 71	izolace
Izolace Sicílie	IT-78, 79, 80	izolace
Izolace Borak	HR-1	izolace
Izolace Turecko II.	TR-81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89	izolace



Obrázek 1 (Vohník a kol. 2015): Anatomie kořene p. Neptunovy, endofytická houbová kolonizace. **A** příčný řez kořenem p. Neptunovy s DSE (dark septate endophytes) kolonizací. S značí stele, která je obklopena E – endodermis. Jako C (cortex) je označena primární kůra s několika lakunami (L). Součástí kortexu je i H – hypodermis, vrstvu kořene s nejčetnější houbovou kolonizací. Na povrchu kořene se nachází R – rhizodermis. Světelný mikroskop s DIC, měřítko = 100 μm ; **B** obdobný snímek jako A pořízený s využitím skenovacího elektronového mikroskopu (SEM), měřítko = 100 μm ; **C**, **D** detaily houbové kolonizace v hypodermis a na povrchu kořene, SEM, měřítka = 50 μm , 25 μm ; **E** vnitrobuněčná mikrosklerocia a hyfový plášť na povrchu kořene. Světelný mikroskop s DIC, měřítko = 25 μm .



Obrázek 2 (Borovec a Vohník 2018): Kořenové vlášení semenáčků posidonie Neptunovy. **a** kořeny mladého semenáčku pokryté hustým kořenovým vlášením; **b** detail kořenového vlášení. **a**, **b** pořízeny stereomikroskopem, měřítko = 0,5 mm; **c** částky substrátu přilnuté ke kořenovému vlášení. Stereomikroskop, měřítko = 1 mm; **d** morfologicky význačné apikální struktury na špičkách některých kořenových vlásků. Světelný mikroskop s DIC, měřítko = 0,1 mm **e-j** detailní snímky apikálních struktur – přísavných pohárků a prstíčkovitých struktur. **e**, **f** – světelný mikroskop s DIC; **g**, **h**, **j** – SEM; měřítko = 25 μ m; **k** detail spirálního tvaru buněčné stěny kořenových vlásků. SEM, měřítko = 100 μ m.



Obrázek 3 (Borovec a Vohník 2018): Houbová kolonizace kořenové vlášení dospělé posidonie Neptunovy. **a** spodní část dospělé posidonie včetně rozsáhlého a větveného kořenového systému. Tenké postranní kořeny (ovál) zpravidla bývají kolonizovány endofytickými houbami, naopak silné světlé kořeny bez větvení (šipky) obvykle nejsou kolonizovány vůbec; **b, c** příčné řezy kořenem p. Neptunovy kolonizované endofytickými houbami na povrchu i v hypodermis (šipky). Světelný mikroskop s DIC, měřítka = 25 μ m; **d, e** tmavé septované houby tvořící na povrchu kořene hyfovou síť. Světelný mikroskop s DIC, měřítka = 50 μ m a 25 μ m; **f** kořeny některých dospělých rostlin tvoří kořenové vlášení s význačnými apikálními strukturami. Světelný mikroskop s DIC, měřítko = 100 μ m; **g** detail apikálních struktur. Světelný mikroskop s DIC, měřítko = 50 μ m

Tabulka 3: Hustota kořenového vlášení a houbová kolonizace posidonie Neptunovy v podskupině semenáčky - dospělci

Průměry hustoty kořenového vlášení a houbové kolonizace kořenů (celková kolonizace, kolonizace povrchovými hyfami, vnitrokořenovými hyfami a vnitrobuněčnými mikrosclerocii) \pm směrodatná chyba jsou zde uvedeny. Význam vlivu ontogenetického stadia i rozdíly mezi vzorky byly vyhodnoceny s využitím zobecněného lineárního modelu s Gaussovskou strukturou chyb a transformační funkcí identity (odlišná písmena značí signifikantně odlišné skupiny).

Vzorek	Hustota koř. vlášení (počet mm ⁻¹)	Celková houbová kolonizace (%)	Povrchové hyfy (%)	Vnitrokořenové hyfy (%)	Mikrosklerocia (%)
Zobecněný lineární model	P = 4.18*10⁻⁷	P = 4.17*10⁻⁷	P = 4.85*10⁻⁷	P = 9.03*10⁻⁴	P = 0.019
Mladé semenáčky (n=30)	33.4 \pm 4.9 a	0 a	0 a	0 a	0 a
Starší semenáčky (30)	15.7 \pm 3.4 a	37 \pm 5.8 b	34 \pm 5.4 b	9 \pm 2.8 b	7 \pm 2.6 b
Dospělé rostliny (30)	0.00 b	33 \pm 4.3 b	25 \pm 3.7 b	7 \pm 1.3 b	12 \pm 3.5 b

Tabulka 4: Hustota kořenového vlášení a houbová kolonizace posidonie Neptunovy v podskupině jíl - písek

Průměry hustoty kořenového vlášení a houbové kolonizace kořenů (celková kolonizace, kolonizace povrchovými hyfami, vnitrokořenovými hyfami a vnitrobuněčnými mikrosclerocii) \pm směrodatná chyba jsou zde uvedeny. Význam vlivu substrátu i rozdíly mezi vzorky byly vyhodnoceny s využitím zobecněného Kruskal-Wallisova testu a post hoc Nemenyiho testu (odlišná písmena značí signifikantně odlišné skupiny).

Vzorek	Hustota koř. vlášení (počet mm ⁻¹)	Celková houbová kolonizace (%)	Povrchové hyfy (%)	Vnitrokořenové hyfy (%)	Mikrosklerocia (%)
Kruskal- Wallisův test	H = 1.01 p = 0.315	H = 8.78 p = 0.003	H = 12.29 p < 0.001	H = 1.92 p = 0.166	H = 1.13 p = 0.289
Jílovitý substrát (n=30)	7.3 \pm 3.2	10 \pm 3.5 a	5 \pm 1.9 a	5 \pm 2.5	3 \pm 2.3
Písčitý substrát (30)	2.8 \pm 1.1	20 \pm 3.9 b	17 \pm 3.8 b	5 \pm 1.6	1 \pm 0.8

Tabulka 5: Frekvence apikálních struktur kořenového vlášení

Průměry hustoty kořenových vlásků, které tvoří morfologicky význačné apikální struktury a procenta kořenových vlásků s apikální strukturou \pm směrodatná chyba jsou uvedeny v tabulce. Rozdíly mezi jednotlivými vzorky byly vyhodnoceny s využitím Kruskal Wallisova testu a rozděleny do skupin podle post hoc Nemenyiho testu (odlišná písmena značí signifikantně odlišné skupiny).

Vzorek	Hustota kořenového vlášení tvořícího apikální struktury (počet mm ⁻¹)	Procento kořenových vlásků tvořících apikální struktury (ze všech kořenových vlásků) (%)
Kruskal-Wallisův test	H = 41.61 p < 0.001	H = 35.10 p < 0.001
Mladé semenáčky (n=30)	16.6 \pm 3.0 a	35.8 \pm 2.9 a
Starší semenáčky (n=30)	10.8 \pm 2.0 a	36.3 \pm 4.6 a
Jílovitý substrát (n=30)	3.3 \pm 1.0 b	16.3 \pm 3.6 b
Písčitý substrát (n=30)	1.7 \pm 0.7 b	10.1 \pm 3.1 b

Tabulka 6: Přehled dosud nepublikovaných izolací hub z kořenů posidonie Neptunovy. V prvním sloupci jsou uvedeny jednotlivé lokality a souhrnný název studie. V případě studie Borak byly všechny izoláty získány na jedné lokalitě, ale lišily se v použitém médiu. Médium “+POS” značí médium s přídavkem sušených a drcených kořenů, oddenků a listů p. Neptunovy. Ve sloupci “Izoláty” je uveden počet získaných hub. Počet jednotlivých morfortypů je uveden v dalších sloupcích.

Lokalita (médium)	Vzorky	Izoláty	Černý	Žlutý	Jiný
Side	150	57	8	29	20
Kaş	150	19	5	8	6
Fethiye	150	18	5	7	6
Marmaris I	150	46	29	10	7
Marmaris II	150	40	27	5	8
Turecko I.	750	180	74	59	47
San Vito Lo Capo I	150	14	6	4	4
San Vito Lo Capo II	150	46	7	13	26
Trabia	150	67	42	17	8
Sicilie	450	127	55	34	38
PDA	125	31	11	12	0
PDA+POS	125	23	16	6	4
GPYA	125	30	10	8	4
GPYA+POS	125	4	0	1	0
MEA	125	8	5	8	7
MEA+POS	125	18	9	0	9
MMN	125	22	10	3	5
MMN+POS	125	6	2	0	0
Borak	142	142	63	38	29
Kabatepe	150	21	8	13	0
Dardanos	150	23	14	7	2
Erdek	150	54	39	10	5
Geyikli	150	27	14	11	2
Geyikli seedlings	150	2	0	1	1
Ayvalik deep	150	14	6	8	0
shallow	150	27	9	8	10
Seferihisar	150	12	2	6	4
Kuşadasi	150	18	4	5	9
Aydincik	150	10	0	4	6
Antalya	150	16	13	2	1
Turecko II.	1650	224	109	75	40